

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 JA903589	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04720	国際出願日 (日.月.年) 14.07.00	優先日 (日.月.年) 15.07.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。
☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

本発明は、立体障害を有する基、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成し、かつDNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害、静電的な反発、スタッキング作用を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸の塩基をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、これらの人工の核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07H21/00-04, C12N15/00-90,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	MASAHIDE ISHIKAWA, et al., "Synthesis of 3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair", Tetrahedron Letters, Vol. 41, No. 20 (May 21, 2000) p. 3931-3934	1-3, 9-15, 17-20, 22-26, 30, 33, 34
PA		4-8, 16, 21, 27-29, 31, 32, 35-40

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.10.00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	MARJORIE S. SOLOMON, et al., "Chemical Synthesis and Characterization of Duplex DNA Containing a New Base Pair: A Nondisruptive, Benzofused Pyrimidine Analog", J. Org. Chem., Vol. 58 (1993) p. 2232-2243	18, 22-26 1-17, 19-21, 27-40
A	JOHANNES J. VOEGEL, et al., "Nonstandard Hydrogen Bonding in Duplex Oligonucleotides. The Base Pair between an Acceptor-Donor-Donor Pyrimidine Analog and a Donor-Acceptor-Acceptor Purine Analog", J. Am. Chem. Soc., Vol. 116 (1994) p. 6929-6930	1-40
A	JOSEPH A. PICCIRILLI, et al., "Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet", NATURE, Vol. 343 (4 JANUARY 1990) p. 33-37	1-40
A	SOPHIE HUSS, et al., "Synthesis of Various Branched Triribonucleoside Diphosphates by Site-Specific Modification of a Diphenylcarbamoyl-Protected Guanine Residue", J. Org. Chem., Vol. 53 (1988) p. 499-506	20



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号
高愛ビル9階
たくみ特許事務所

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]

発送日
(日.月.年)

17.10.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA903589

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP00/04720

国際出願日
(日.月.年)

14.07.00

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

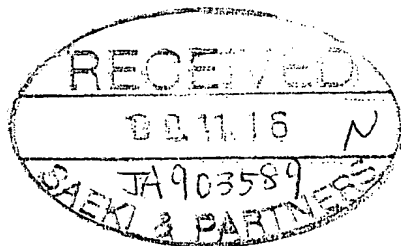
国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00)	
Applicant's or agent's file reference JA903589	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04720	International filing date (day/month/year) 14 July 2000 (14.07.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters **"NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
15 July 1999 (15.07.99)	11/201450	JP	04 Sept 2000 (04.09.00)
02 May 2000 (02.05.00)	2000/133519	JP	04 Sept 2000 (04.09.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Tessadel PAMPLIEGA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/05801 A1

(51) 国際特許分類: C07H 21/02, 21/04, C12N
15/00, 1/21, 5/10, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04720

(22) 国際出願日: 2000 年 7 月 14 日 (14.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/201450 1999 年 7 月 15 日 (15.07.1999) JP
特願2000/133519 2000 年 5 月 2 日 (02.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平尾 一郎

(HIRAO, Ichiro) [JP/JP]; 〒351-0036 埼玉県朝霞市
北原2-7-9-403 Saitama (JP). 石川正英 (ISHIKAWA,
Masahide) [JP/JP]; 〒351-0105 埼玉県和光市西大和
団地4-10-306 Saitama (JP). 藤原健志 (FUJIHARA,
Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町
25-17 モトハシフラワー2F Saitama (JP). 横山茂之
(YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都
文京区向丘1-20-6-607 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL NUCLEIC ACID BASE PAIR

(54) 発明の名称: 新規な核酸塩基対

(57) Abstract: A novel artificial nucleic acid base pair which is obtained by forming a selective base pair by introducing a group having steric hindrance (preferably a group having steric hindrance and static repulsion and a stacking effect) and can be recognized by a polymerase such as DNA polymerase; a novel artificial gene; and a method of designing nucleic acid bases so as to form a selective base pair with the use of steric hindrance, static repulsion and stacking effect at the base moiety of the nucleic acid. An artificial nucleic acid comprising these bases; a process for producing the same; a codon containing the same; a nucleic acid molecule containing the same; a process for producing a non-natural gene by using the same; a process for producing a novel protein by using the above nucleic acid molecule or non-natural gene, and the like.

[続葉有]

WO 01/05801 A1



(57) 要約:

本発明は、立体障害を有する基、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成し、かつDNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害、静電的な反発、スタッキング作用を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸の塩基をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、これらの人工の核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

明 細 書

新規な核酸塩基対

技術分野

本発明は、立体障害を利用した選択的な新規人工核酸塩基対の形成に関する。

また、本発明は、本発明の新規人工核酸塩基対を使用した核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸に関する。より詳細には、本発明は、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成させることができる、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用した選択的な塩基対を形成させることができる新規な人工核酸、その製造方法、それを含むコドン、それを含む核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

背景技術

地球上の生物は、すべて遺伝子としてアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類の塩基からなる核酸を用い、AとT、GとCの特異的な塩基対形成によってその遺伝情報を伝えている。また、遺伝子DNAから転写されたmRNA中の遺伝情報に従ってタンパク質が合成される。その際、3塩基からなる64種類（ $4^3 = 64$ ）のコドンがそれぞれ20種類のアミノ酸に対応している。

もし、4種類（A、G、C、T）の既存の塩基に加えて新規な核酸塩基（X、Y）（ここでは、XとYが特異的に塩基対を形成する）を創製することができればコドンの種類が飛躍的に増大し（ $6^3 = 216$ ）、新たにできたコドンを非天然型アミノ酸に対応させることにより、非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成が可能となる（J. D. Bain, et al., Nature, 356, 537-539 (1992)）。

これまで、A-T及びG-C以外の人工塩基対として、イソシトシンとイソグアニンが報告されているが、イソグアニンの互変異性のためにイソシトシンより

もチミンと塩基対を形成し易い事が問題となっている (C. Switzer, et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 8322-8323 (1989); C. Y. Switzer, et al., Biochemistry, 32, 10489-10496 (1993).)。また、その他にもいくつかの新規塩基対の報告があるが、いずれもまだ、ポリメラーゼによる認識に問題があり実用化されていない (J. A. Piccirilli, et al., Nature, 343, 33-37 (1990); J. Horlacher, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6329-6333 (1995); J. C. Morales, et al., Nature struct. biol., 5, 954-959 (1998))。

ところで、様々な機能をもつ核酸分子がインビトロセクション法によって見いだされているが (A. D. Ellington, et al., Nature, 346, 818-822 (1990); C. Tuerk, et al., Science, 249, 505-510 (1990))、前記した X-Y のような新規な塩基対が DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase)、RNA ポリメラーゼ (RNA polymerase) 及び逆転写酵素 (reverse transcriptase) の各種ポリメラーゼ (polymerases) に認識されれば、現在、4 種類の塩基で行われているインビトロセクション法を 6 種類の塩基で行うことができ、4 種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製の可能性が期待できる。

また、遺伝子の 1 個又は 2 個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、新しい塩基対の創製が期待されている。

本発明者らは、天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を創製すべく鋭意研究してきたところ、立体障害を利用することにより天然の核酸との塩基対の形成を阻害することができ、新たにデザインされた核酸同士で選択的に塩基対を形成させ得ることを見出した。さらに、このようにデザインされた核酸が天然の各種ポリメラーゼに十分認識されることも見出した。

例えば、チミン (thymine) と塩基対を形成しないようにチミンの 6 位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2, 6-ジアミノプリン (2,6-diaminopurine) の 6 位のアミノ基に嵩高いメチル基を 2 つ導入した 2-アミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ) プリン (2-amino-6-(N,N-dimethylamino) purine) (この塩基を X という。) をデザインする。こうしてこの X は、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの 6 位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-

2-オン (pyridin-2-one) (この塩基を Y という。) などの塩基は、この X と塩基対を形成することができることを見出した (第 1 図参照)。

さらに、プリン環の 6 位に立体障害を起こし得るジメチルアミノ基を導入した 2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル) プリン (2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)purine) (このものを、d X という。) を含む DNA オリゴマーと、3-(2'-デオキシ-5'-トリホスホロ-β-D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (3-(2'-deoxy-5'-triphosphoro-β-D-ribofuranosyl)pyridin-2-one) (このものを、d YTP という。) を化学合成し、d YTP あるいはそのリボヌクレオチド体 (r YTP) が、前記の d X の相補鎖として DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼによって選択的に DNA や RNA 中に取り込まれることを見出した。

しかし、このものは、第 2 図の a 及び b に示されるように、この塩基 (第 2 図 a の d x) 中の 6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン (あるいはウリジン) (第 2 図 b 参照) やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、この立体障害が前後に存在する塩基にも影響を与えることから、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、Klenow フラグメントによる d YTP の取り込み効率は低く、d x に対するチミジン三リン酸 (dTTP) の取り込みを抑えるには充分ではなかった。

そこで、本発明者らは、立体障害だけでなく、塩基相互間の静電的な反発や、前後の塩基とのスタッキング作用を考慮した新たな人工の塩基対を検討しところ、選択性の優れた人工の塩基対を得ることができることを見出した。

発明の開示

本発明は、DNA ポリメラーゼなどのポリメラーゼによって塩基対が認識される際に、塩基対間の立体障害を利用して、より好ましくはさらに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせ、さらに好ましくは天然型の塩基との静電的な反発が利用でき得る塩基を選択することにより選択的に新規人工核酸塩基対が形成されうるという概念を提供するも

のである。

即ち、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を提供するものである。さらに、本発明は、これらの人工の核酸、それを含むコドン、核酸分子、非天然型の遺伝子、及びそれらの応用方法を提供するものである。

本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基、好ましくは核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものであり、また当該立体障害及び静電的な反発により、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、スタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させる方法に関する。

また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害を利用して選択的な塩基対を形成させる、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法に関し、より詳細には、当該立体障害の利用、好ましくは当該立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基、好ましくは核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させ得る核酸に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基、好ましくは当該立体障害及び静電的な反発を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用を有する基により前後の塩基と安定に存在するためのものであり、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対

であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸、及びその製造方法に関する。

即ち、本発明は、天然の塩基を含有する核酸類と同様な挙動をすることができる新規な人工の核酸、及びこのような核酸をデザインする方法を開示するものであり、本発明の核酸は天然の核酸と同様な応用をすることができる。

したがって、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を用いた各種の応用に関する。

より詳細には、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個以上含有してなるコドンに関し、当該コドンは天然の核酸と同様にアミノ酸をコードすることができ、当該アミノ酸としては非天然型のアミノ酸であることもできる。また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子に関し、当該核酸分子は天然の核酸と同様に蛋白質をコードすることができ、また、当該核酸分子は天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持することもできる。このような核酸分子に各種のポリメラーゼ作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造することもでき、本発明はこのような相補鎖の製造方法にも関する。

また、天然の遺伝子の一部に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を導入又は置換することができ、したがって、本発明は天然の遺伝子に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法に関し、これらの導入又は置換を前記した本発明のコドン単位にて行うこともできる。

さらに、本発明は、前記した方法により得ることができる非天然型の遺伝子又は前記した本発明の核酸分子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法に関し、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を含有するコドンが非天然型のアミノ酸をコードするようにした場合には、天然の蛋白質の一部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質を製造することができる。

したがって、本発明の方法により天然の蛋白質の一部が、他の天然型又は非天然型のアミノ酸、好ましくは非天然型のアミノ酸に置換又はそれらが導入された

新たな蛋白質を製造する方法を提供するものであり、それにより天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることができ、本発明は天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法にも関する。

また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸（以下、単に本発明の核酸という。）を含有する非天然型の遺伝子で形質転換された微生物にも関する。

さらに、本発明の新規な塩基対は、天然の塩基と対を形成しないので、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病等の治療に有用であり、本発明は新規な塩基対又はその一方の塩基からなる医薬組成物を提供するものである。

本発明は、天然の核酸の塩基とは塩基対を形成せず、かつポリメラーゼに認識され得る人工の核酸を提供することであるが、従来の人工の核酸は水素結合の位置のみを変更しようとしたために天然の核酸の塩基との塩基対の形成を実質的に阻害することはできず、塩基対の選択性が十分ではなかった。本発明は、係る選択性を立体障害を起こす基、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入するという手法で解決したものであり、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成することができる最初の人工核酸を提供するものである。

したがって、以下で本発明を具体例に基づいてより具体的に説明してゆくが、これらの具体例は本発明をよりよく理解させるためのものであり、本発明がこれらの具体例に限定されるものでないことは前述した本発明の技術的思想から明らかである。

本発明の核酸における塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、好ましくない塩基との水素結合を阻害することができる程度のもので、核酸の塩基としての性質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でな

い箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、例えば、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、*t*-ブチル基などの低級アルキル基、好ましくは分枝した低級アルキル基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基からなる低級アルコキシ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたジ低級アルキルアミノ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたシリル基などが挙げられる。

このような立体障害を起こさせ得る基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

また、本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、塩基相互間の好ましくない水素結合を阻害することができる程度の立体障害を有する基で、静電的な反発を有する基で、かつスタッキング作用を有するための環状の π 電子系を有する基であって、核酸の塩基としての性質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でない箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、平面構造を有する芳香複素環式基が好ましい。このような芳香複素環式基は、分子の平面方向において十分な立体障害を起こさせるだけの大きさを有し、異種原子による静電的な反発を起こさせることができ、そして芳香複素環式基の π 電子系によるスタッキング作用も期待することができる。

このような芳香複素環式基としては、より具体的には、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基が挙げられる。これらの芳香複素環式基は、縮合環式、多環式、又は単環式のいずれのものであってもよいが、立体的な大きさからは単環式のものが好ましい。また、これらの芳香複素環式基は必要により各種の置換基を有するものであってもよいが、立体的な制限や好ましくない水素結合が生起することから通常は大き

な置換基を持たないものが好ましい。このような置換基としては、水酸基、アミノ基、カルボニル基、炭素数 1 ～ 5 程度の低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルアミノ基、ニトロ基などが挙げられる。

このような立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

また、本発明の核酸はポリメラーゼに認識され得る人工の核酸であり、ポリメラーゼとしては、いずれのポリメラーゼであってもよいが、好ましくは DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼが挙げられる。また、最近のポリメラーゼの構造解析の結果は、全てのポリメラーゼと核酸の相互作用が本質的に同じであることを示しており、本発明の塩基対の形成はポリメラーゼ反応の本質に関わるものであり、以下で具体的な説明で用いた DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼに限定されるものではなく、逆転写酵素などを含め全てのポリメラーゼにおいても利用することができる。

さらに、最近の分子の立体配置の解析方法や原子間距離の精密な測定方法などにより、核酸の立体配置が計算されるので、これらの結果に基づいて立体障害を起こし、かつ他の位置で相互の核酸の塩基が 1 個又は 2 個以上、好ましくは 2 個の水素結合をし得る塩基の化学構造をデザインすることができる。したがって、本発明は核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害、好ましくはさらにこれに加えて静電的な反発並びにスタッキング作用に基づいて人工の核酸をデザインする方法を包含するものである。本発明の塩基対のデザインに当たっては、ワトソン・クリック型塩基対によるデザインが通常であるが、フーグスティーン型塩基対によりデザインしてもよい。

本発明の核酸は、核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害に基づいてその化学構造がデザインされた人工の核酸であればよく、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成するものであればよい。好ましくは、これらの人工の核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得るものであり、ポリメラーゼの作用により天然の核酸と同様にその相補鎖が合成されるものが好ましい。

本発明の核酸は、通常の化学合成法によっても合成することができるが、この方法に限定されるものではない。化学的な合成法の例を第 3 図、第 4 図及び第 5

図に例示する。

本発明の核酸を、核酸の配列の中に組み込む方法としては、天然の核酸を組み込む通常の方法を又はこれに準じた方法により行うことができる。例えば、DNA合成装置による方法や、ポリメラーゼによる方法や、ポイントミューテーション技術などに準じて行うことができる。また、従来の天然の核酸と同様な標識化を行うこともできる。

したがって、本発明は遺伝子断片やプローブなどとして使用される核酸分子であって、前記した本発明の核酸を含有する核酸分子を包含する。本発明の核酸分子は1個又は2個以上の本発明の核酸を含有するものであり、1本鎖のものであっても2本鎖のものであってもよい。また、本発明の非天然型の遺伝子は、天然の遺伝子の一部又は全部を本発明の核酸で置換したもの、天然の遺伝子に本発明の核酸を1個又は2個以上を付加したもの、又はこれらを組み合わせたものが包含される。このような本発明の非天然型の遺伝子は、従来の天然型の遺伝子の改変と同様な方法又は従来の方法に準じた方法により行うことができる。

したがって、本発明の核酸分子や非天然型の遺伝子は、従来の天然型のものと同様にこれを適当なベクターに挿入して又はファージなどを用いて、適当な微生物を本発明の核酸を含有する遺伝子により形質転換することができる。

また、本発明の核酸を含む新たなコドンを設計することができる。例えば、本発明の新規な人工の核酸の塩基をX及びYとすると、XXY、XYX、YXXなどのこれらの塩基の組み合わせや、AXA、TYT、CGX、ATX、などの天然の核酸の塩基との組み合わせによるコドン进行を設計することができる。新たなコドンは、天然型のアミノ酸をコードさせることもできるし、また、非天然型のアミノ酸をコードさせることもできる。さらに、転写や輸送などの機能をコードさせることもできる。このように本発明は新規な人工の核酸を提供するのみならず、本発明の核酸を含む新たなコドンの設計による、全く新しい遺伝暗号の設計を可能とするものであり、新たな遺伝暗号の世界を提供するものである。

本発明の新たなコドンに応じたtRNA系を設計することにより、非常に多くのアミノ酸を利用可能とする新たな蛋白質合成システムを設計することができる。利用可能なアミノ酸はリボソームにおける蛋白質合成酵素系で利用できるもので

あればよい。したがって、本発明は前記した本発明のコドンをもちいた新たな蛋白質合成システムを提供するものでもある。

従来、天然の蛋白質中の一部のアミノ酸を非天然型のアミノ酸に置換したり、非天然型のアミノ酸を挿入することは極めて困難であったが、本発明の蛋白質合成システムによれば希望する位置のコドンの核酸を本発明の核酸に置換又は導入することにより、所望の非天然型のアミノ酸を含有する蛋白質を製造することが可能となる。そして、このようなアミノ酸の変更を行うことにより、蛋白質中の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることが可能となる。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の立体障害を利用新規人工核酸塩基対 (X-Y) を示すものである。第1図中のRは、2-デオキシ-β-D-リボフラノシル基を示す。

第2図は、立体障害による塩基対 (第2図a及びb) と、立体障害、静電的な反発及びスタッキング作用を利用した新規人工核酸塩基対 (X₂-Y) を示すものである。

第3図は、本発明の塩基Xを有する核酸のdXのアミダイト試薬の合成スキームを示すものである。

第4図は、本発明の塩基Yを有する核酸のdYTPの合成スキームを示すものである。

第5図は、本発明の塩基X₂を有する核酸のdx₂のアミダイト試薬の合成スキームを示すものである。

第6図は、5'末端を³²Pラベルしたプライマー1 (0.5 μM) 及びテンプレート1、3 (1 μM) と種々のdNTP (150 μM) を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動によって示すものである。反応は17℃で30分間行った。

第7図は、5'末端を³²Pラベルしたプライマー2 (1 μM) 及びテンプレート1、2、3 (2 μM) とdNTP (150 μM) を用いたクレノウフラグメントによるシングルヌクレオチド挿入反応を示すものである。反応は17℃で30分間行った。Aは20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動の図であり、

Bはその結果をグラフにしたものである。

第8図は、プライマー2及びテンプレート1、2、3と $[\alpha-^{32}\text{P}]$ TTPあるいは $[\alpha-^{32}\text{P}]$ dCTPを用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応のdYTPによる阻害実験を示すものである。

Aは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート3 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha-^{32}\text{P}]$ TTP ($150\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、50、150、300及び500 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

Bは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート1 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha-^{32}\text{P}]$ TTP ($50\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び1000 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で10分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

Cは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート2 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha-^{32}\text{P}]$ CTP ($50\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び1000 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

第9図は、5'末端を ^{32}P ラベルしたプライマー3 ($0.33\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート4、5、6、7、8、9 ($1\ \mu\text{M}$) と種々のdNTP ($150\ \mu\text{M}$) を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を示すものである。反応は 17°C で60分間行った。

第10図は、テンプレート1-3と $[\alpha-^{32}\text{P}]$ rATPならびに種々のrNTPsを用いたT7RNAポリメラーゼによる転写反応によって生成したRNAを電気泳動で調べた結果である。

第11図は、すべてのrNTPを共存させて第10図と同様の転写を行い、生成したRNAを電気泳動で精製し、これをRNase T2によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元TLCで解析した結果である。

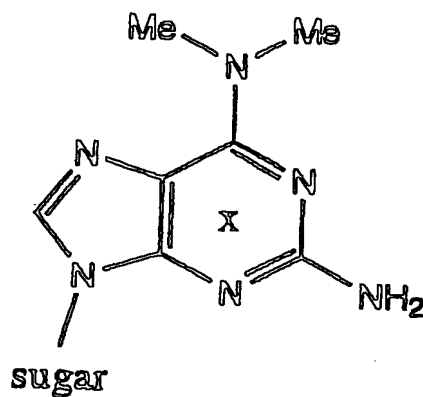
第 1 2 図は、本発明の X 2 塩基に対する各種の塩基の取り込み結果を示す、図面に代わる写真である。

第 1 3 図は、X 2 塩基を含有するテンプレートを用いて、すべての r N T P を共存させたときに生成した R N A を電気泳動で精製し、これを R N a s e T 2 によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元 T L C で解析した結果を示すものである。

発明を実施するための最良の形態

次の本発明を具体例により詳細に説明する。

人工の塩基のひとつである 2, 6 - ジアミノプリンはチミンの 6 位のケト基と水素結合をし、チミンと塩基対を形成することがある。このものがチミンと塩基対を形成しないようにチミンの 6 位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2, 6 - ジアミノプリンの 6 位のアミノ基に嵩高いメチル基を 2 つ導入した次式で示される、



2 - アミノ - 6 - (N , N - ジメチルアミノ) プリン (以下、この塩基を X という。) をデザインした。

こうしてこの X は、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの 6 位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン - 2 - オン (以下、この塩基を Y という。)

などの塩基は、このXと塩基対を形成することができた（第1図参照）。第1図の下段は、これらの塩基X及びYが他の塩基と対を形成できない様子を示している。

次に、塩基対X-Yの立体障害を利用した選択的な新規核酸塩基対形成を検証するために、DNAのプライマー伸長反応（Primer extension）法とDNAからRNAを合成する転写反応を用いた。プライマー伸長反応法とは、鋳型（template）となるDNAオリゴマーにプライマーとなるオリゴマーをアニーリングさせ、DNAポリメラーゼと2'-デオキシヌクレオシド-5'三リン酸（dNTP）を加えることにより、プライマーの3'末端にテンプレートの相補的な配列を伸長させるものである。転写反応は、DNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するものである。ここでは、DNAポリメラーゼの一つである大腸菌由来のDNAポリメラーゼIからその5'-エクソヌクレアーゼを取り除いたクレノウフラグメント（Klenow fragment）を、また、RNAポリメラーゼとしてはT7ファージ由来のT7 RNAポリメラーゼを用いた。どちらの酵素も現在最も良く用いられているものの一つである。

まず、鋳型となるDNAにXを組み込むため、dXのアミダイト試薬を化学合成し（第3図参照）、次に示す塩基配列を有するdXを含む鋳型DNA（Template 3、5、6、7、8、9）、また対照実験に用いる鋳型（Template 1、2、4）及び、それらのプライマー（Primer 1、2、3）を合成した。

dXを含む鋳型DNA（Template 3、5、6、7、8、9）

Template 3: dtgctctxtcttccctatagtgagtcgtattat

Template 5: dagctxtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 6: dagctxxgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 7: dagctxtxtgtgtctccggtacaactaggc

Template 8: dagctxtgxgtgtctccggtacaactaggc

Template 9: dagctxtgtxtgtctccggtacaactaggc

対照実験に用いる鋳型（Template 1、2、4）

Template 1: dtgctctatcttccctatagtgagtcgtattat

Template 2: dtgctctgtcttccctatagtgagtcgtattat

Template 4: dagctgtgtgtgtctccggtacaactaggc

プライマー (Primer 1、2、3)

Primer 1 : dgcactcactataggg

Primer 2 : dctatagggaggaga

Primer 3 : dgcctagttgtaccg

また、基質となる d Y T P や r Y T P の合成も行った (第 4 図参照)。

ついで、プライマーの 5' 末端を T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (polynucleotide kinase) と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ A T P を用いて ^{32}P ラベルした。 ^{32}P ラベルされたプライマー 1 ($0.5 \mu\text{M}$) 及びテンプレート 1、3 ($1 \mu\text{M}$) と種々の d N T P ($150 \mu\text{M}$) (N は種々の塩基を示す。) を用いて、クレノウフラグメント (0.2 ユニット/ μl) によるプライマー伸長反応を、 17°C で 30 分間行った。

この実験に用いたプライマーとテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート 1 を用いた場合:

Primer 1 : $5' - ^{32}\text{pCGACTCACTATAGGG}$

Template 1: $3' - \text{TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTATCTCGT}$

テンプレート 3 を用いた場合:

Primer 1 : $5' - ^{32}\text{pCGACTCACTATAGGG}$

Template 3: $3' - \text{TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTXTCTCGT}$

結果を 20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲルに電気泳動をし、それをイメージングプレート (Phosphoroimager analysis) を用いて分析した結果を第 6 図に示す。第 6 図の左側 5 個の A G、A G C、A G T、A G Y 及び A G C T はテンプレート 1 を用いた場合を、右側の 5 個はテンプレート 3 を用いた場合を示す。この結果、塩基 Y は A、G 及び X の相補鎖に取り込まれ、X の相補鎖には Y の他に C、T が取り込まれることがわかった (第 6 図参照)。

さらに、これらの取り込みを定量するため、5' 末端を ^{32}P ラベルしたプライマー 2 ($1 \mu\text{M}$) とテンプレート 1、2 及び 3 ($2 \mu\text{M}$) を用い、d N T P ($150 \mu\text{M}$) を 1 種類だけ加えて同様の実験を行った。

この実験に用いたプライマーとテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート 1 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²pCTATAGGGAGGAGA

Template 1: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTATCTCGT

テンプレート 2 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²pCTATAGGGAGGAGA

Template 2: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTGTCTCGT

テンプレート 3 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²pCTATAGGGAGGAGA

Template 3: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTXTCTCGT

この結果を第 7 図の A 及び B に示す。この結果、Y は A、G 及び X の相補鎖にそれぞれ 78%、48% 及び 41% 取り込まれることがわかった。また、X の相補鎖には、Y、C 及び T がそれぞれ 41%、9.5% 及び 13% 取り込まれることがわかった (第 7 図参照)。

Y は単独では X だけでなく A や G にも取り込まれることがわかったので、次に、Y が T や C と共存するとき、それぞれの相補鎖に対してどちらが取り込まれやすいかを調べるために、以下のような競争実験を行った。

ラベルされていないプライマー 2 とテンプレート 3 をアニールさせ、これに [α -³²P] TTP と種々の量の dYTP を加え、 [α -³²P] TTP の X の相補鎖への取り込みが dYTP によって阻害されるかを調べた。また、同時に dATP も加えることにより、この阻害が X のつぎの T の相補鎖に対する A の取り込みにも影響するかを調べた (第 8 図の A 参照)。その結果、dYTP を [α -³²P] TTP とほぼ等量加えると [α -³²P] TTP の X の相補鎖への取り込みが 50% 阻害されることがわかった。同様の実験をテンプレート 1 及び 2 を用いて、A や G に対して行った結果、dYTP は [α -³²P] TTP の A の相補鎖への取り込み及び [α -³²P] CTP の G の相補鎖への取り込みに対しては全く阻害しないことがわかった (第 8 図の B (テンプレート 1)、C (テンプレート 2) 参照)。したがって、dYTP の A や G への取り込みは、TTP や dCTP 共存させることによって抑えられることがわかった。

また、鋳型上に X が 2 個あった場合に Y 及び C や T の X の相補鎖への取り込み

がどうなるかを調べるために、5'末端を ^{32}P ラベルしたプライマー3とテンプレート4、5、6、7、8及び9を用いてプライマー伸長反応法を行った。その結果、テンプレート上にXが連続して2つあるといずれの塩基を用いてもポリメラーゼ反応が2つのXの場所で停止してしまうことがわかった。2個のXの間に3つの別の塩基が挿入された場合のみ、Yだけが2個目のXの相補鎖にも取り込まれ、相補鎖合成が進むことがわかった（第9図参照）。

同様にXを含むDNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによる転写反応が進行するかも調べた。鋳型にテンプレート1-3を用い、この配列上のプロモータ領域を2本鎖化して、 $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ を加えてT7 RNAポリメラーゼによる転写反応を行った。

この実験に用いたプライマー領域とテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート1-3を用いた場合：

Coding strand : 5'-ATAATACGACTCACTATAGGG

Template 1-3 : 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTNTCTCGT

(テンプレート1 : N = A、

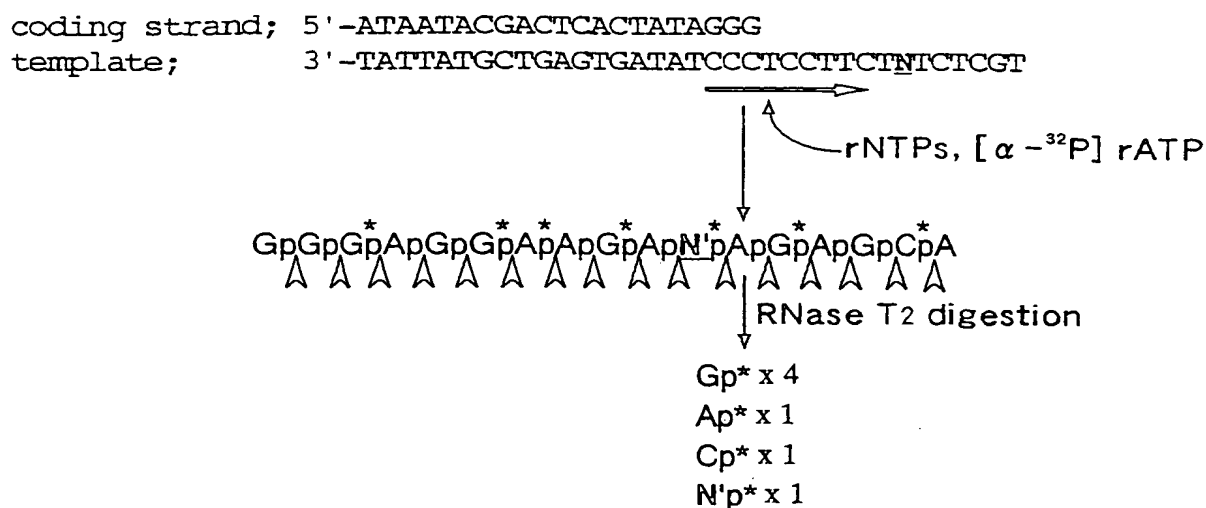
テンプレート2 : N = G、

テンプレート3 : N = X)

この結果を第10図に示す。テンプレート3 (N = X) の場合には、Xに対してYが選択的に取り込まれた生成物に相当するバンドが電気泳動上で認められた。ただし、Uも僅かながら取り込まれている。テンプレート1 (N = A) の場合には、Aの相補鎖にUだけでなく、Yも取り込まれてしまうことが分かった。テンプレート2 (N = G) では、Cのみが取り込まれ、Yの取り込みによる生成物はほとんど認められなかった。

次に全てのrNTPが共存する際の転写反応を行った。先の実験と同様にテンプレート1 (N = A) 及び3 (N = X) を用い $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ を加えてT7 RNAポリメラーゼによる転写反応を、rATP 2 mM、rGTP 2 mM、rCTP 2 mM、UTP 2 mM、及びrYTP 1 mMの条件で行い、次いでRNase T2により生成した全長のRNAを完全分解し、3'端が標識されたヌクレオ

チドを 2 次元 T L C で分析した。この実験の概要を次の式で示す。



この結果を第 1 1 図に示す。第 1 1 図中の丸で囲んだスポットは UV で観測されたスポットであることを示す。第 1 1 図の A はテンプレート 3 (N = X) の場合の結果を示し、第 1 1 図の B はテンプレート 1 (N = A) の場合の結果を示す。それぞれの場合の各塩基の理論値と実測値を次の表 1 に示す。

表 1 各テンプレートを用いた場合の塩基の理論値と実測値

塩基	テンプレート 3 (N = X)		テンプレート 1 (N = A)	
	理論値	実測値	理論値	実測値
G p	4	4	4	4
A p	1	1 . 0 5	1	0 . 9 2
C p	1	0 . 9 4	1	0 . 7 8
U p	0	0 . 0 8	1	0 . 9 8
Y p	1	0 . 8 2	0	0 . 0 4

この結果、テンプレート 3 (N = X) の転写反応では、X に対して Y がほぼ選

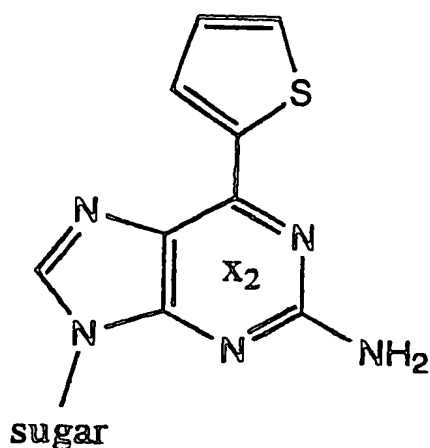
択的に取り込まれていて、Uは微量ながらわずかに検出された。また、テンプレート 1 (N=A) の場合には、Yは全く取り込まれていなかった。

以上のように、このようにデザインされた塩基Xは、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(塩基Y)などの塩基は、このXと塩基対を形成することができ(第2図a及びb参照)、塩基対X-Yの選択的な核酸塩基対の形成が検証された。

しかし、このdx中の6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン(あるいはウリジン)(第2図b参照)やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、KlenowフラグメントによるdYTPの取り込み効率は低く、dxに対するチミジン三リン酸(dTTP)の取り込みを十分に抑えることが出来なかった。

そこでこのジメチルアミノ基の代わりに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせるために平面構造を有する芳香族系の置換基をdxの6位に導入することを行った。

この実験に当たって、その一例として6位にチオフェンを導入した次式で示される、



2-アミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリン (dx2: この新しい塩基をX2とし、先の2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリンをdxとする) の合成を行い、この塩基を含む鋳型に対するdYTPやrYTPの取り込みを調べた。

鋳型DNA合成用のdx2のアミダイト試薬の調製法の概要を第5図に示した、詳細は実施例2を参照されたい。このアミダイト試薬は、DNA合成において通常の市販のアミダイト試薬と同様のカップリング収率を示した。

まず、Klenowフラグメント (exo+) を用いて、鋳型中のdx2に対するdYTPの取り込みを調べた (実施例10参照)。

テンプレート及びプライマーとして次の塩基配列のものを使用した。

プライマー 5'-³²pACTCACTATAGGGAGGAAGA-

テンプレート 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCT-N-TCTCGT

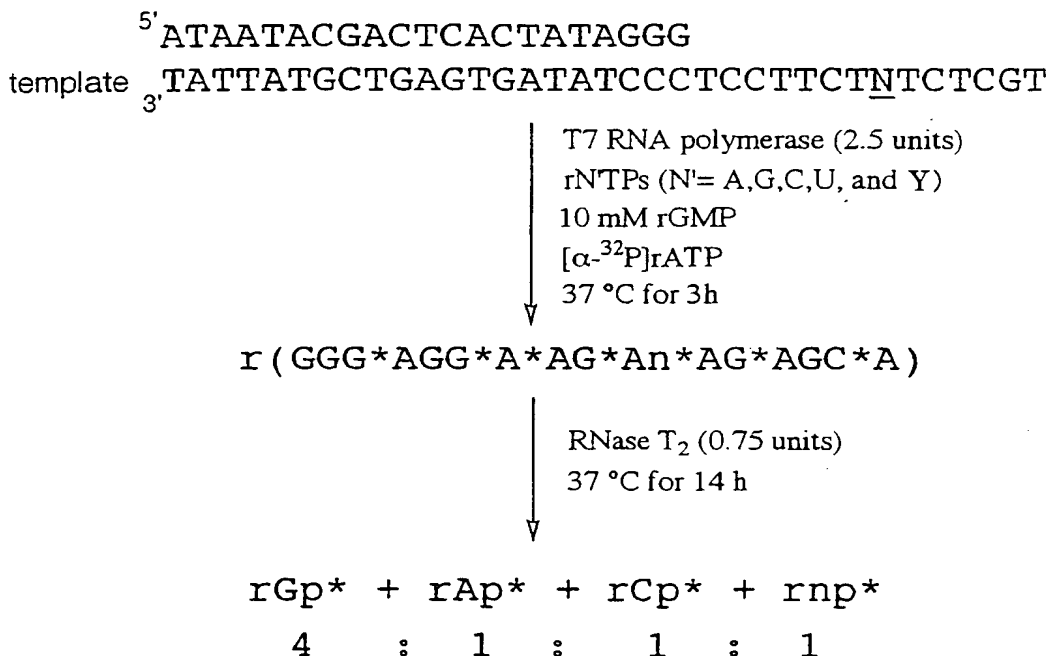
テンプレートのNの箇所に本発明の塩基X、塩基X2及び対照としてAの塩基を結合させて各種の塩基の取り込み実験を行った。結果を第12図に示す。第12図にレーン1及び2は対照として使用したアデニン(A)におけるシトシン(C)とチミン(T)の取り込みを示している。

この結果、先のdxに対するdYTPの取り込み効率は21% (レーン3) で

あったが、 $d x 2$ を用いることにより40%（レーン8）まで取り込み効率が上昇した。同条件での天然型の $d A$ に対する $d T T P$ の取り込み効率が57%（レーン2）であることと比較すると、 $d x 2$ によりかなりの改善が見られたことになる。 $d x$ に比べて $d x 2$ は、 $d C T P$ の取り込みが大きくなっている（22%）（レーン11）が、それでも $d Y T P$ の取り込み（40%）に比べるとそれほど大きな値であるということとはできない。

このKlenowフラグメント（ $e x o^+$ ）による実験の結果から、先の $d x$ から $d x 2$ を用いることにより、 $d x 2$ に対する $d C T P$ の取り込み効率が上昇したが、これは、シトシンの4-アミノ基と $d x 2$ 中のチオフェンの硫黄原子との相互作用によるものと思われる（第2図f参照）。また、このように $d x 2$ 中のチオフェンの硫黄原子が塩基対面に向いたときは、チミン（T）の4-ケト基と静電的な反発が予想され、これは、塩基対の形成を阻害する要因として、立体的な障害に加えて、静電的な反発（第2図e参照）を用いることができることを示している。これらのことから、 $d x 2$ 中のチオフェンは、硫黄原子の側が塩基対面に向いていると考えられる。

次に、T7 RNAポリメラーゼによる鋳型中の $d x 2$ に対する $r Y T P$ のRNA中への取り込みを、次に示す反応、



によって調べた（実施例 11）。

この方法で製造された次の



（n はテンプレートの塩基 N に対応する塩基を示し、右肩のアスタリスクは標識化されていることを示す。）

塩基配列を有する RNA を、RNase T₂ で分解して、次いで 2 次元 TLC（セルロース樹脂）により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。

第 13 図にその TLC の展開図を示す。また、次の表 2 にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

表 2

template	rGp*	rAp*	rCp*	rUp*	rYp*
<u>N</u> = x ₂	3.982 (4)	1.052 (1)	0.950 (1)	0.047 (0)	0.969 (1)
<u>N</u> = A	3.939 (4)	1.035 (1)	0.995 (1)	1.032 (1)	not detected (0)

表 2 中のカッコ内は、理論値を示す。

この結果、d x 2 を用いても高い選択性で r Y T P が d x 2 に対してのみ取り込まれることがわかった。先の d x を鋳型に用いた場合にも良い結果が既に得られていたが、同様の条件で d x 2 を鋳型に用いて転写反応を行い、d x 2 に対して R N A 中に取り込まれたヌクレオチドの組成分析を行っても、同様に高い選択性で r Y T P が d x 2 に対してのみ取り込まれたことになる。

以上のように、本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な塩基対の形成を提供するものである。そして、本発明は、このような選択的な塩基対の形成を、塩基の立体障害、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用することによって実現できることを明らかにするものである。前記の各種の実験に使用した塩基は、本発明を例示するものであり、そして選択的な人工の塩基対を形成させるために必要な前記した本発明の考え方が正しいことを実証するものである。したがって、本発明は前記で例示した具体的な塩基に限定されるものではなく、本発明の考え方に基づいて生成される塩基対を全て包含できるものである。

さらに本発明の塩基対は天然の合成酵素類に認識され得るものであることも前記で示したように実証され、天然の D N A や R N A などの合成、転写などの系において天然のものと同様に核酸の複製、転写などがおこなわれ得るものである。したがって、本発明は、天然の遺伝子の機能発現のシステムにおいて、そのまま適用可能な新規な人工塩基対を形成させるためのコンセプトを提供するものであり、本発明の塩基を用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できることが示され、天然の遺伝子のシステム

に応用できるだけでなく、天然の遺伝子のシステムの機能や作用の解明のために応用することも可能である。

実施例

以下に実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

実施例 1 : 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-[[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ]ホスフィノ]-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル]プリン
(2-Benzamino-6-(N,N-dimethylamino)-9-[5'-O-dimethoxytrityl-3'-O-[[(diisopropylamino)-2-cyanoethoxy]phosphino]-2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl]purine) (10) の合成 (第 3 図参照)

(A) 2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2',3',5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン (2) の合成

2-アミノ-6-クロロ-9-(2',3',5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン (1) (M. J. Robins and B. Uznanski, Can. J. Chem., 59, 2601-2607 (1981).) (18.6 mmol, 7.96 g) を、無水ピリジンで 3 回共沸脱水後、無水ピリジン (180 ml) に溶解し、室温で攪拌したところへ、ジメチルアミン塩酸塩 (55.8 mmol, 4.55 g)、ジイソプロピルエチルアミン (74.4 mmol, 12.9 ml) を加え、室温で 15 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残渣にクロロホルムを加え、有機層を水で 3 回、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、水で 1 回、10% クエン酸水溶液で 2 回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残渣がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (2) を 5.42 g (12.4 mmol) (67%) 得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 7.56 (s, 1H, H8),

6.02 (d, 1H, H1', J = 5.0 Hz), 5.95 (dd, 1H, H2', J = 5.0 Hz),
 5.79 (t, 1H, H3', J = 5.0 Hz), 4.69 (s, 2H, 2-NH₂),
 4.42-4.45 (m, 1H, H4'), 4.34-4.40 (m, 2H, H5', H5''),
 3.43 (br, 6H, N-CH₃), 2.13, 2.10, 2.08 (s, 3H, Ac).

(B) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン(3)の合成

前記(A)で得た化合物(2)(10 mmol, 4.36 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(180 ml)に溶解し、室温で攪拌したところへ、塩化ベンゾイル(15 mmol, 1.74 ml)を加え、室温で14時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残渣にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残渣がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン-ジクロロメタン)で精製し、目的物(3)を3.53 g (6.53 mmol) (65%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H, H8),
 7.96 (d, 2H, Bz-m, J = 10.0 Hz), 7.75 (s, 1H, NHBz),
 7.55 (dd, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5),
 6.08 (d, 1H, H1', J = 3.0 Hz), 5.96-6.01 (m, 2H, H2', H3'),
 4.39-4.50 (m, 3H, H4', H5', H5''), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
 2.15 (s, 3H, Ac), 2.10 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac).

(C) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(β-D-リボフラノシル)プリン(4)の合成

前記(B)で得た化合物(3)(6.53 mmol, 3.53 g)にピリジン-メタノール-水(65:30:5) 50 mlを加え、氷浴中で攪拌したところへ、2M水酸化ナトリウム-ピリジン-メタノール-水(65:30:5)溶液 50 mlを加え、氷浴中で15分間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に塩化アンモニウム(5.21g)

を加え 40 ml になるまで減圧濃縮した。その溶液にクロロホルムを加え、有機層を抽出し、水層をクロロホルム-ピリジンで 2 回抽出した後、有機層を集め硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を 10 ml になるまで減圧濃縮し、そこにトルエンを加え減圧濃縮すると結晶が析出した。結晶を濾取し、減圧下 90℃で乾燥し、目的物 (4) を 2.87 g 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.28 (s, 1H, H8),

7.92 (dd, 2H, Bz-m, $J = 7.0$ Hz), 7.57 (dd, 1H, Bz-p, $J = 7.3$ Hz),

7.49 (t, 2H, H Bz-o, $J = 7.5$), 5.91 (d, 1H, H1', $J = 4.0$ Hz),

5.48 (d, 1H, OH, $J = 5.5$ Hz), 5.15 (d, 1H, OH, $J = 4.0$ Hz),

5.04 (t, 1H, OH, $J = 1.0$ Hz), 4.56 (t, 1H, H2', $J = 10.0$ Hz),

4.17 (d, 1H, H3', $J = 3.0$ Hz), 3.93 (d, 3H, H4', $J = 3.5$ Hz),

3.63-3.65 (m, 1H, H5'), 3.52-3.56 (m, 1H, H5''),

3.48 (br, 6H, N-CH₃).

(D) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(3', 5'-
-O-テトライソプロピルジシロキサニル- β -D-リボフラノシル) ブリン
(5) の合成

前記 (C) で得た化合物 (4) (5.0 mmol, 2.07 g) を無水ピリジンで 3 回共沸脱水した後、無水ピリジン (50 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサン (5.5 mmol, 1.76 ml) を加え室温で 14 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (5) を 2.63 g (4.0 mmol) (80%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl₃) δ : 8.22 (s, 1H, H8),

7.89 (d, 2H, Bz-m, $J = 5.0$ Hz), 7.80 (s, 1H, NHBz),

7.55 (dd, 1H, Bz-p, $J = 7.5$ Hz), 7.48 (t, 2H, Bz-o, $J = 7.5$ Hz),

5.91 (s, 1H, H1'), 4.84 (dd, 1H, H3', J = 5.5 Hz),
4.50 (d, 1H, H2', J = 5.5 Hz), 4.07-4.20 (m, 2H, H4', H5'),
4.06 (d, 1H, H5'', J = 13.0 Hz), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
0.95-1.08 (m, 28H, iPr).

(E) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-O-フェノキシチオカルボニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシル)プリン(6)の合成

前記(D)で得た化合物(5)(3.98 mmol, 2.61 g)を無水トルエンで3回共沸脱水した後、無水ジクロロメタン(40 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら1-メチルイミダゾール(7.96 mmol, 0.64 ml)とクロロチオ炭酸フェニル(5.57 mmol, 0.77 ml)を加え室温で16時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。有機層を抽出後、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、水で1回、10%クエン酸水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製し、目的物(6)を2.96 g(3.73 mmol)(94%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.17 (s, 1H, H8),
7.87 (d, 2H, Bz-m, J = 3.0 Hz), 7.79 (s, 1H, NHBz),
7.55 (t, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.47 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz),
7.41 (d, 2H, PhO-o, J = 7.5 Hz), 7.29 (t, 2H, PhO-m, J = 7.5 Hz),
7.13 (d, 1H, PhO-p, J = 10.0 Hz), 6.39 (d, 1H, H2', J = 5.0 Hz),
6.11 (s, 1H, H1'), 5.14-5.17 (m, 1H, H3'), 4.23-4.26 (m, 1H, H5'),
4.07-4.12 (m, 1H, H4', H5''), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
0.99-1.15 (m, 28H, iPr).

(F) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシル)プリン(7)の合成

前記 (E) で得た化合物 (6) (3.73 mmol, 2.96 g) を無水トルエンで 3 回共沸脱水した後、無水トルエン (88 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら 2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル (0.746 mmol, 122 mg) を加え、室温下アルゴンガスを 1 時間バブリングさせる。そこに、水素化トリブチルスズ (5.60 mmol, 1.51 ml) を加え 75℃ で 3.5 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (7) を 2.27 g (3.55 mmol) (95%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (s, 1H, H8),

7.90 (d, 2H, Bz-m, $J = 5.0$ Hz), 7.83 (s, 1H, NHBz),

7.54 (t, 1H, Bz-p, $J = 7.5$ Hz), 7.48 (t, 2H, H Bz-o, $J = 7.5$ Hz),

6.29 (dd, 1H, H1', $J = 7.5$ Hz), 4.80-4.83 (m, 1H, H3'),

3.97-4.07 (m, 2H, H5', H5''), 3.86-3.88 (m, 1H, H4'),

3.50 (br, 6H, N-CH₃), 2.68-2.71 (m, 1H, H2'),

2.59-2.63 (m, 1H, H2''), 1.03-1.09 (m, 28H, iPr).

(G) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシー- β -D-リボフラノシル)プリン (8) の合成

前記 (F) で得た化合物 (7) (3.55 mmol, 2.27 g) を 1 M テトラブチルアンモニウムフロライド-テトラヒドロフラン溶液 (14 ml) に加え、室温で 15 分間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をクロロホルムに溶解し、少量の水で洗った後、水層をクロロホルムで 4 回抽出し、有機層を集めて硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を減圧濃縮し、トルエンでピリジン臭のしなくなるまで共沸を繰り返し、残査をメタノールに溶解した。そこに少しずつジクロロメタンを加え結晶化させた。結晶を濾取し、減圧下乾燥し、目的物 (8) を 0.964 g (2.42 mmol) (68%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.23 (s, 1H, H8),

7.84 (d, 2H, Bz-m, $J = 7.5$ Hz), 7.50 (t, 1H, Bz-p, $J = 7.3$ Hz),

7.42 (t, 2H, H Bz-o, $J = 7.5$ Hz), 6.25 (t, 1H, H1', $J = 7.0$ Hz),

5.21 (s, 1H, OH), 4.89 (s, 1H, OH), 4.33 (s, 1H, H3'),
 3.77 (s, 1H, H4'), 3.50-3.53 (m, 1H, H5'), 3.43-3.46 (m, 1H, H5''),
 3.48 (br, 6H, N-CH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, H2'),
 2.16-2.18 (m, 1H, H2'').

(H) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル) プリン (9) の合成

前記の (G) で得た化合物 (8) (1.47 mmol, 0.585 g) を無水ピリジンで3回共沸脱水した後、無水ピリジン (10 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら4, 4'-ジメトキシトリチルクロライド (1.61 mmol, 547 mg) を加え室温で1.5時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮する。残査がピリジン臭がなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール 0.5% トリエチルアミン) で精製し、目的物 (9) を0.99 g (1.41 mmol) (96%) 得た。

¹H-NMR (270.16 MHz, CDCl₃) δ: 8.20 (s, 1H, H8), 7.79 (s, 1H, NHBz),
 7.77 (d, 2H, Bz-m, J = 1.4 Hz), 7.76 (d, 1H, Bz-p, J = 3.5 Hz),
 7.14-7.51 (m, 11H, H Bz-o, DMTr), 6.72 (dd, 4H, DMTr),
 6.45 (t, 1H, H1', J = 6.5 Hz), 4.78 (m, 1H, H3'),
 4.14 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 3.50 (br, 6H, N-CH₃),
 3.39-3.47 (m, 1H, -H5'), 3.30-3.33 (m, 1H, H5''),
 2.80-2.85 (m, 2H, H2', H2'').

(I) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-[[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ] ホスフィノ]-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル] プリン (10) の合成

前記 (H) で得た化合物 (9) (0.864 mmol, 0.605 g) を無水ピリジンで 3 回、無水テトラヒドロフランで 2 回共沸脱水した後、無水テトラヒドロフラン (6 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら N, N-ジイソプロピルエチルアミン (2.59 mmol, 0.452 ml) とクロロ-2-シアノエトキシ-N, N-ジイソプロピルアミノホスフィン (1.73 mmol, 0.385 ml) を加え室温で 2 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に無水メタノールを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え、有機層を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 1 回飽和食塩水で 3 回洗った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール 2% トリエチルアミン) で精製した後、少量のクロロホルムに溶解し、ヘキサンで再沈殿を行い、目的物 (10) を 0.574 g (0.638 mmol) (74%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270.16 MHz, CDCl_3) δ : 8.14 (s, 1H, H8), 8.13 (s, 1H, H8), 7.72 (s, 1H, NHBz), 7.65-7.70 (m, 2H, Bz-m), 7.16-7.47 (m, 12H, H Bz-p,o, DMTr), 6.70-6.75 (m, 4H, DMTr), 6.27-6.41 (m, 1H, H1'), 4.63-4.80 (m, 1H, H3'), 4.20-4.27 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH_3), 3.24-3.72 (m, 10H, H5', H5'', $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$, N-CH_3), 2.83-3.00 (m, 1H, H2'), 2.40-2.64 (m, 5H, H2'', $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 1.06-1.19 (m, 12H, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (109.36 MHz, CDCl_3) δ : 149.25.

実施例 2: 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-O-[(ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル]プリン (22) の合成法 (合成経路を第 5 図に示す。)

(A) 2-イソブチリルアミノ-6-ヨード-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ- O -イソブチリル- β -D-リボフラノシル)プリン (18) の合成

2-イソブチリルアミノ-6-アミノ-9-(2-デオキシ-3,5-ジ-
-イソブチリル-β-D-リボフラノシル)プリン(17) (Babara L. Gaffney,
Luis A. Marky and Roger A. Jones, Tetrahedron, 40, 3-13 (1984)) 2.3
8 g (5 mmol) をアルゴン雰囲気下で60℃に加熱し、n-pentyl nitrite 1
3.5 ml (0.10 mol) とジヨードメタン 25 ml (0.31 mol) を
素早く加え懸濁した。この混合物を60℃でよく攪拌しながら200 Wハロゲン
タングステンランプにより光源距離2 cmで可視光を3時間外部照射した。反応
溶液に30 mlの飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加え室温で3時間攪拌した。そ
の後120 mlの飽和亜硫酸ナトリウム水溶液と150 mlのクロロホルムを加
え分液した。水相をクロロホルムでさらに2回抽出した。得られた有機相を無水
硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮した。残渣をショートカラム(展開溶媒 酢酸エ
チル:ジクロロメタン=1:4)で精製し目的物(18)を1.01 g (1.7
2 mmol) (34.4%) 得た。

¹H-NMR(270 MHz, CDCl₃) δ:

8.19 (s, 1H), 8.14 (bs, 1H), 6.42 (dd, J = 7.4, 6.4 Hz, 1H),
5.44 (m, 1H), 4.41 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 3.00 (m, 1H),
2.80 (m, 1H), 2.58 (m, 3H), 1.17 (m, 18H).

(B) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ
-3,5-ジ- α -イソブチリル-β-D-リボフラノシル)プリン(1
9)の合成

前記(A)で得た(18) 294 mg (0.5 mmol) をアルゴン雰囲気下
で80 mlのチオフェンに溶解し、ファイレックス製光反応容器に移した。アル
ゴン気流下、400 W水銀ランプ紫外線を24時間照射した。照射後の反応溶液
を濃縮し、残渣をショートカラム(展開溶媒 イソプロパノール:ジクロロメタ
ン=3:197)で精製し目的物(19)を212 mg (0.39 mmol)
(78.0%) 得た。

¹H-NMR(270 MHz, CDCl₃) δ:

8.63 (dd, J = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.10 (bs, 1H),

7.64 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.47 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H),
5.44 (m, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.37 (m, 1H), 3.18 (m, 1H),
3.00 (m, 1H), 2.61 (m, 3H), 1.24 (m, 18H).

(C) 2-イソブチルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシル)プリン(20)の合成

前記(B)で得た(19) 212 mg (0.39 mmol)を氷冷下1 M水酸化ナトリウム(ピリジン:メタノール:水=13:6:1) 1.95 mlに溶解し、15分間攪拌した。反応溶液に5%塩化アンモニウム水溶液を加え中和した。1.2 gのセライトを加え減圧下完全に溶媒を除いた。残渣をショートカラム(展開溶媒 5~7%エタノール-ジクロロメタン)で精製し目的物(20)を147 mg (0.37 mmol) (93.6%)得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ :

10.45 (bs, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.60 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H),
7.90 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 4.6, 3.5$ Hz, 1H),
6.39 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H),
4.91 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.55 (m, 2H),
2.96 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 1.11 (m 6H).

(D) 2-イソブチルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル)プリン(21)の合成

前記(C)で得た(20) 98 mg (0.24 mmol)を1 mlの無水ピリジンで3回共沸した。残渣を2 mlの無水ピリジンに溶解し、トリエチルアミン 35 ml、ジメチルアミノピリジン 1.4 mgそして塩化ジメトキシトリチル 85 mgを加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液に25 mlの酢酸エチルを加え25 mlの水で3回分液し、有機相を得た。各々の水相を酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をショートカラム(展開溶媒 25~50%酢酸エチル-ジクロロメタン)で精製し目的物

(21) 132 mg (0.19 mmol) (76.7%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.64 (dd, $J = 3.6, 0.9$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.92 (bs, 1H),
7.61 (dd, $J = 4.3, 0.9$ Hz, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.24 (m, 8H),
6.77 (m, 4H), 6.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.79 (m, 1H),
4.13 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H),
3.44 (dd, $J = 10.23, 5.8$ Hz, 1H),
3.38 (dd, $J = 10.23, 4.4$ Hz, 1H), 2.91 (m, 1H),
2.60 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.27 (m, 6H).

(E) 2-イソブチルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-オ-[(ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-オ-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル]プリン
(22)の合成

前記(D)で得た(21) 125 mg (0.18 mmol)を0.5 mlの無水ピリジンで3回共沸し、0.5 mlの無水テトラヒドロフランで3回共沸した。残査をアルゴン雰囲気下1.2 mlの無水テトラヒドロフランに溶解し、ジイソプロピルエチルアミン46 ml、そして塩化(2-シアノエトキシ)(N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン59 mlを加え、室温で1時間攪拌したのち50 mlのメタノールで未反応の塩化物を分解した。反応溶液に25 mlの3%トリエチルアミン含有酢酸エチルを加え25 mlの水で3回分液し、有機相を得た。各々の水相を3%トリエチルアミン含有酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残査をショートカラム(展開溶媒 3%トリエチルアミン-32%酢酸エチル-65%ヘキサン)で精製し、目的物(22) 139 mg (0.16 mmol) (92.2%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.64 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.61 (m, 1H),
7.26 (m, 2H), 7.24 (m, 8H), 6.78 (m, 4H), 6.45 (m, 1H),
4.75 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.75 (m, 6H), 3.70 (m, 4H),

3.36 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.48 (m, 1H),
1.95 (m, 1H), 1.18 (m, 18H).

^{31}P -NMR (270 MHz, CDCl_3): 149.51, 148.43 ppm.

実施例 3 : 3 - (2' - デオキシ - 5' - オートリホスホリル - β - D - リボフラノシル) ピリジン - 2 - オン (d Y T P) (16) の合成 (第 4 図参照)

(A) 3 - (3', 5' - オートトライソプロピルジシロキサニル - β - D - リボフラノシル) ピリジン - 2 - オン (12) の合成

3 - (β - D - リボフラノシル) ピリジン - 2 - オン (11) (J. Matulic-Adamic and L. Beigelman, Tetrahedron Lett., 38, 203-206 (1997).) (2.29 mmol, 520 mg) を、無水ピリジンで 3 回共沸脱水後、無水ピリジン (23 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、1, 3 - ジクロロ - 1, 1, 3, 3 - テトライソプロピルジシロキサン (2.52 mmol, 0.81 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に水を加えて反応を止めた後、減圧濃縮した。残渣をクロロホルムに溶解し、有機層を 5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン - メタノール) で精製し、目的物 (12) を 442 mg (0.94 mmol) (41 %) 得た。

^1H -NMR (270.06 MHz, CDCl_3) δ : 13.07 (br, 1H, NH),

7.78 (d, 1H, H4, $J = 6.8$ Hz), 7.37 (d, 1H, H6, $J = 4.6$ Hz),

6.29 (t, 1H, H5, $J = 6.6$ Hz), 5.07 (s, 1H, H1'),

4.01-4.30 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H5''), 0.83-1.10 (m, 28H, iPr).

(B) 3 - (2' - オ - イミダゾチオカルボニル - 3', 5' - オートトライソプロピルジシロキサニル - β - D - リボフラノシル) ピリジン - 2 - オン (13) の合成

前記 (A) で得た化合物 (12) (0.94 mmol, 442 mg) を無水トルエンで 3 回共

沸脱水後、無水DMF (9 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら、チオカルボニルイミダゾライド (2.24 mmol, 401 mg)を加え、室温で7時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に酢酸エチルを加え、有機層を水で2回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (13) を 434 mg (0.749 mmol) (80%) 得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CDCl₃) δ: 13.40 (br, 1H, NH),
 8.44 (s, 1H, imidazolid), 7.84 (d, 1H, H4, J = 6.8 Hz),
 7.73 (s, 1H, imidazolid), 7.33 (d, 1H, H6, J = 6.5 Hz),
 7.07 (s, 1H, imidazolid), 6.34 (t, 1H, H5, J = 6.8 Hz),
 6.23 (d, 1H, H2', J = 5.1 Hz), 5.25 (s, 1H, H1'),
 4.46-4.52 (m, 1H, H3'), 4.25-4.29 (m, 1H, H5'),
 4.03-4.09 (m, 2H, H4', H5''), 0.87-1.09 (m, 28H, iPr).

(C) 3-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン (14) の合成

前記 (B) で得た化合物 (13) (0.749 mmol, 434 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、硫酸アンモニウム (8.4 mg)を加え、ヘキサメチルジシラザン (12.6 ml)に溶解し、1時間還流した。反応液を減圧濃縮後、無水トルエンで3回共沸脱水し、アゾビスイソブチロニトリル (83.5 mg)を加え、無水トルエン (16.8 ml)に溶解した。そこに、水素化トリブチルスズ (0.821 ml)を加え1時間還流した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (14) を 0.268 g (0.591 mmol) (79%) 得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CDCl₃) δ: 13.07 (br, 1H, NH),
 7.72 (d, 1H, H4, J = 7.0 Hz), 7.31 (d, 1H, H6, J = 6.5 Hz),
 6.29 (t, 1H, H5, J = 6.6 Hz), 5.20-5.25 (m, 1H, H1'),
 4.37-4.40 (m, 1H, H3'), 3.97-4.12 (m, 2H, H5', H5''),
 3.80-3.84 (m, 1H, H4'), 2.26-2.36 (m, 1H, H2'),

1.77-1.86 (m, 1H, H2"), 0.90-1.09 (m, 28H, iPr).

(D) 3-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン
(15)の合成

前記(C)で得た化合物(14)(0.089 mmol, 42 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、1 Mテトラメチルアンモニウムフルオライド/THF溶液(0.5 ml)を加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に酢酸(0.08 ml)を加え、減圧濃縮した。残渣を水に溶解し、酢酸エチルで3回洗った後、水層を減圧濃縮した。残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的物(15)を10.4 mg (0.047 mmol) (52%)得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CD₃OD) δ: 7.77 (d, 1H, H4, J = 3.8 Hz),
7.36 (d, 1H, H6, J = 3.5 Hz), 6.41 (t, 1H, H5, J = 3.6 Hz),
5.01-5.17 (m, 1H, H1'), 4.29-4.31 (m, 1H, H3'),
3.93-3.95 (m, 1H, H4'), 3.62-3.70 (m, 2H, H5', H5"),
2.31-2.35 (m, 1H, H2'), 1.89-1.95 (m, 1H, H2").

(E) 3-(2'-デオキシ-5'-オトリホスホリル-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン(16)の合成

前記(D)で得た化合物(15)(0.059 mmol, 13.4 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、リン酸トリメチル(0.2 ml)に溶解し、氷冷下オキシ塩化リン(0.065 mmol, 7.1 μl)を加え、氷冷下7時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応溶液に0.5 M ビストリブチルアンモニウムピロホスフェイト (bis-tributylammonium pyrophosphate) - DMF溶液とトリブチルアミン(70.2 μl)をよく攪拌した混合溶液を素早く加え、氷冷下30分間よく攪拌した。反応溶液に1 M重炭酸トリエチルアンモニウム (triethylammonium bicarbonate) (0.35 ml)を加えて反応を停止し、減圧濃縮した。残渣を水に溶かし、DEAE-セファデックスA-25 カラムクロマトグラフィー(15×300 mm)にのせ、50 mM-1 M重炭酸トリエチルアンモニウムのグラジエントで溶出し、0.53-0.59 Mで溶出された画分を分取し、凍結乾燥した。

MS(ESI-)、 ^1H -NMR および ^{31}P -NMR により構造を確認した後、ダウエックス (Dowex) 50Wx8 カラムクロマトグラフィーによりナトリウム塩にした。

MS(ESI-): (M-H⁻) 449.9.

^1H -NMR (270.06 MHz, D₂O) δ : 7.83 (d, 1H, H4, J = 4.9 Hz),
7.35 (d, 1H, H6, J = 4.9 Hz), 6.51 (t, 1H, H5, J = 4.9 Hz),
5.17 (t, 1H, H1', J = 5.0 Hz), 4.56 (br, 1H, H3'),
4.06 (br, 1H, H4'), 3.99 (br, 2H, H5', H5''),
2.19-2.33 (m, 1H, H2'), 1.81-1.98 (m, 1H, H2'').

^{31}P -NMR (109.36 MHz, D₂O) δ : -10.3 (m, 2P, P¹, P³),
-22.7 (m, 1P, P²).

UV (10 mM phosphate buffer pH7.0): λ_{max} = 298 nm (ϵ = 7.6×10^3),
226 nm (ϵ = 7.0×10^3), λ_{min} = 247 nm, 211 nm.

実施例 4 : プライマー及びテンプレートの合成

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部の DNA/RNA 合成機 392 型により、同事業部より販売されている、dA, dC, dG, T の各シアノエチルアミダイト試薬と上記の方法で合成した dX のシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、以下に示すプライマーおよびテンプレートを合成した。

ただし、dX を含むオリゴマーの合成においては、dX のアミノ基の保護基であるベンゾイル基の除去が常法の濃アンモニア中 55℃、一夜の条件では、完全に除去できなかったもので、濃アンモニア中 80℃、10 時間処理することにより、完全に除去した。

Primer 1: dcgactcactataggg

Primer 2: dctatagggaggaga

Primer 3: dgcctagttgtaccg

Template 1: dtgctctatcttcctccctatagtgagtcgtattat

Template 2: dtgctctgtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 3: dtgctctxtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 4: dagctgtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 5: dagctxtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 6: dagctxxgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 7: dagctxtxtgtgtctccggtacaactaggc

Template 8: dagctxtgxgtgtctccggtacaactaggc

Template 9: dagctxtgtxtgtctccggtacaactaggc

実施例 5 : プライマーの 5' - ^{32}P 標識

0.5 ml のチューブにプライマー 1 - 4 (ca. 1 nmol)、10 x ポリヌクレオチドキナーゼ (polynucleotide kinase) バッファー (TAKARA) 2 μl 、[γ - ^{32}P] - dATP (ca. 1.1 TBq / mmol) 2 μl 、およびポリヌクレオチドキナーゼ (10 unit / μl , TAKARA) 2 μl を加え、全量 20 μl で、37℃、40 分間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 10 μl を加えて反応を停止し、75℃、5 分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動 (10 × 10 cm) をした。UV (254 nm) でメインバンドを切り出し、1.5 ml チューブに移し滅菌水を 450 μl を加えて、37℃、12 時間攪拌した。軽く遠心した上清を別のチューブに移し、グリコーゲン 1 μl 、3 M 酢酸ナトリウム 40 μl およびエタノール 1 ml を加え、よく攪拌した後、-30℃で 1 時間放置した。-5℃、13,000 rpm で 1 時間遠心した後、沈殿を 70% エタノールでリンスし、遠心エバポレーターで 30 分間乾燥した。そこに、滅菌水 40 μl を加え、75℃で 5 分間加熱した後、UV (260 nm) で定量した。

実施例 6 : クレノウフラグメント (Klenow Fragment) を用いたシングルヌクレオチド挿入反応とプライマー伸長反応

0.5 ml のチューブに 5' - ^{32}P ラベルしたプライマー、テンプレートおよび 10

x クレノウフラグメントバッファー (TAKARA) 1 μ l を加え全量を 7 μ l にして、95℃で3分間、40℃で3分間、4℃で7分間アニーリングした後、dNTP 1 μ l、クレノウフラグメント (1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA) 2 μ l を加え、全量を 10 μ l にして、17℃で所定の時間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 5 μ l を加えて反応を停止し、75℃、5分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動をした。それを、イメージングプレート (Phosphorimager analysis) を用いて分析した。

結果を第6図、第7図、第9図に示す。シングルヌクレオチド挿入反応を第7図に、プライマー伸長反応を第6図、第9図にそれぞれ示す。

実施例7：クレノウフラグメントを用いたプライマー伸長反応の阻害実験

0.5 ml のチューブにプライマー、テンプレートおよび 10 x クレノウフラグメントバッファー (TAKARA) 1 μ l を加え全量を 7 μ l にして、95℃で3分間、40℃で3分間、4℃で7分間アニーリングした後、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ TTP あるいは $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTP および dYTP をそれぞれの終濃度になるように加え、クレノウフラグメント (1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA) 2 μ l を加え、全量 10 μ l にして、17℃で所定の時間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 5 μ l を加えて反応を停止し、75℃、5分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動をした。それを、イメージングプレート (Phosphorimager analysis) を用いて分析した。

結果を第8図に示す。

実施例8：T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

プロモーター領域を二本鎖化した 1 μ M の鋳型 DNA と 2.5 units の T7 RNAポリメラーゼを、2 mM rNTP - 0.1 μ Ci / μ l の $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ rATP を含む溶液 (40 mM Tris-HCL (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 10 mM rGMP,) に加え、3時間インキュベートした。反応後、これに 10 M 尿素を含む色素を加え、75℃で3分間加熱し、20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、生成物を分析した。

結果を第10図に示す。

実施例9：T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

実施例8と同様の反応を行い、生成したRNAをゲル電気泳動で単離し、0.75 unitsのRNase T2でRNAを分解し、それぞれのヌクレオチドを二次元TLCで分離し、それぞれの比を求めた。

結果を第11図に示す。また、先の表1にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

実施例10：Klenowフラグメント (exo⁺) を用いた1ヌクレオチド挿入反応

[5' - ³²P] ラベルしたプライマーDNA (20-mer, 4mM)、鋳型DNA (35-mer, 4mM) および2x Klenowフラグメント用緩衝液 (TAKARA) を含む溶液を、95℃3分間、40℃3分間、4℃7分間アニーリングした後、これに等量の40mM dNTPとKlenowフラグメント (exo⁺) (2 units, For Sequencing, TAKARA) の溶液を加え、37℃で30分インキュベートした。これに等量の10M urea-BPB dye溶液を加えて、75℃で5分間加熱した後、20%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動を行った。Phosphorimagerプレートを用いて生成物の分析を行った。結果を第12図に示す。

実施例11：T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

プロモーター領域を二本鎖化した1mMの鋳型DNA、2.5 unitsのT7 RNAポリメラーゼ、2mM rNTP、0.1mCi/mlの[α-³²P] rATPを含む溶液 (40mM Tris-HCl (pH 8.0)、8mM MgCl₂、2mM spermidine、5mM DTT、0.01% Triton X-100、10mM rGMP) を調製し、3時間インキュベートした。これに10M尿素を含む色素溶液を加え、75℃で3分間加熱し反応を停止した。この溶液中の生成物のRNA (16-mer) を20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。このRNAを0.75 unitsのRNase T2で分解し、2次

元 TLC (セルロース樹脂) により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。第 13 図にその TLC の展開図を示す。また、先の表 2 にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

実施例 12 : 塩基 X2 を含有するプライマー及びテンプレートの合成

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部の DNA/RNA 合成機 392 型により、同事業部より販売されている、dA、dC、dG、T の各シアノエチルアミダイト試薬と実施例 1 の方法に準じて合成した dx₂ のシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、プライマー及びテンプレートを合成した。

ただし、ここで用いた dx₂ の 2-アミノ基の保護基のイソブチリル基は、オリゴマー合成後の通常の塩基性条件下 (55℃、10 時間の濃アンモニア水処理) での脱保護法では完全に除去できなかったもので、80℃、10 時間の濃アンモニア水処理を行った。

産業上の利用可能性

本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な塩基対形成が立体障害、及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用することによって実現可能であることを示したものである。本発明の方法により、核酸の複製、転写、および、これを用いてタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できる。例えば、本発明の人工塩基対を用いることにより、天然の 4 種類の塩基で行われているインビトロセレクション法を 6 種類の塩基で行うことができ、4 種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製や、さらに遺伝子の 1 個又は 2 個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、本発明の新しい塩基対を利用することも可能となる。

請 求 の 範 囲

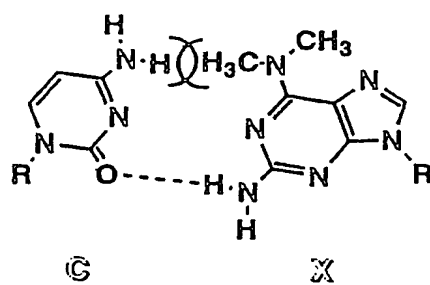
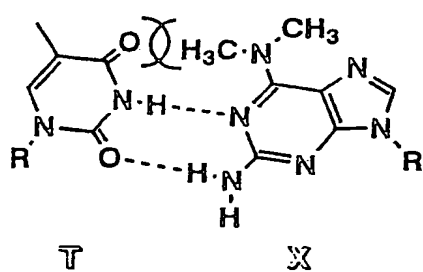
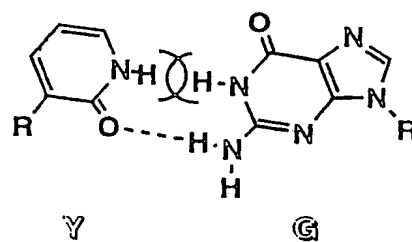
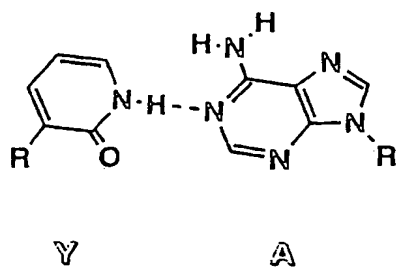
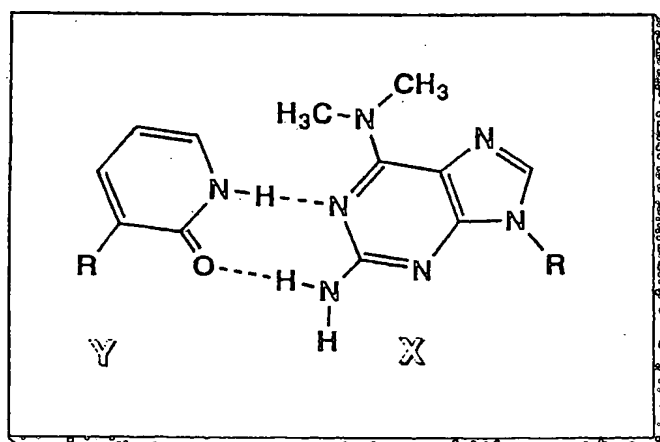
1. 核酸の塩基部分に、塩基相互間の立体障害を起こさせ得る基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。
2. 立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 立体障害を起こさせ得る基が、ジアルキルアミノ基である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 核酸の塩基部分に、塩基相互間の立体障害及び静電的な反発、並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。
5. 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求の範囲第4項に記載の方法。
6. 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、芳香複素環式基である請求の範囲第4項又は第5項に記載の方法。
7. 芳香複素環式基が、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基である請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 芳香複素環式基が、チオフェンである請求の範囲第6項又は第7項に記載の方法。
9. さらに、新たな水素結合を形成し得る基を導入する請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。
10. 新たな水素結合を形成し得る基が、アミノ基、水酸基、ケト基又は窒素原子の電子対である請求の範囲第9項に記載の方法。
11. 塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の方法。
12. ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求の範囲11に記載の方法。
13. 核酸の塩基部分における立体障害を利用して、選択的な塩基対を形成させ

るように核酸をデザインする方法。

14. 立体障害の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
15. 核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
16. 立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらにスタッキング作用を有することにより安定化させることにより選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
17. 核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求の範囲第13項～第16項のいずれかに記載の核酸をデザインする方法。
18. 請求の範囲第13項～第17項のいずれかに記載の方法でデザインされた核酸。
19. 核酸が、6位に立体障害を起こさせ得る基を有するプリン誘導体からなる塩基を含有するものである請求の範囲第18項に記載の核酸。
20. 核酸の塩基が、2-アミノ-6-N, N-ジメチルアミノ-プリンである請求の範囲第19項に記載の核酸。
21. 核酸の塩基が、2-アミノ-6-チエニル-プリン又はその誘導体である請求の範囲第19項に記載の核酸。
22. 核酸が、2位にヒドロキシ基又はケト基を有するピリジンからなる塩基を含有するものである請求の範囲第18項に記載の核酸。
23. 核酸の塩基が、ピリジン-2-オン又はその互変異性体である請求の範囲第22項に記載の核酸。
24. 核酸が、その相補的な核酸と塩基対を形成している核酸である請求の範囲第18項～第23項のいずれかに記載の核酸。
25. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を製造する方法。
26. 核酸が、塩基対を形成し得る他方の核酸である請求の範囲第25項に記載の製造方法。
27. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を1個以上含有してなるコドン。

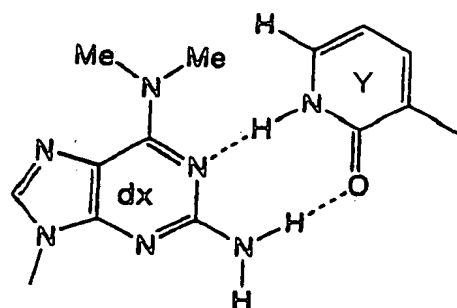
28. コドンがアミノ酸をコードするものである請求の範囲第27項に記載のコドン。
29. アミノ酸が非天然型のアミノ酸である請求の範囲第28項に記載のコドン。
30. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子。
31. 核酸分子が蛋白質をコードしてなる請求の範囲第30項に記載の核酸分子。
32. 核酸分子が、天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持している請求の範囲第30項又は第31項に記載の核酸分子。
33. 請求の範囲第30項～第32項のいずれかに記載の核酸分子にポリメラーゼを作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造する方法。
34. ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求の範囲33に記載の方法。
35. 天然の遺伝子に、請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法。
36. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を導入又は置換された位置が、コドン単位となっており、他の部分のアミノ酸配列が天然のものと変更されていない塩基配列となる請求の範囲第35項に記載の非天然型の遺伝子を製造する方法。
37. 請求の範囲第30項～第32項のいずれかに記載の核酸分子、又は請求の範囲第35項又は第36項の方法で得ることができる非天然型の遺伝子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法。
38. 天然の蛋白質のアミノ酸の一部又は全部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質である請求の範囲第37項に記載の蛋白質を製造する方法。
39. 請求の範囲第35項又は第36項に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子で形質転換された微生物。
40. 請求の範囲第35項又は第36項に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子を用いて、天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法。

第 1 図

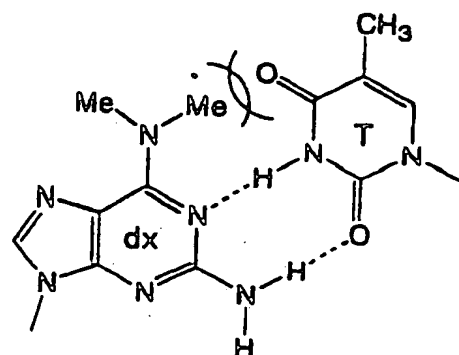


第 2 図

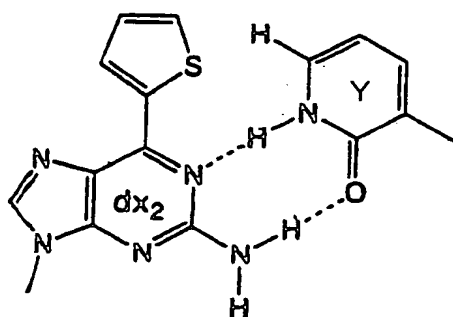
a



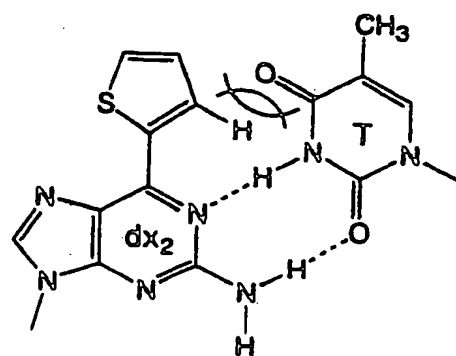
b



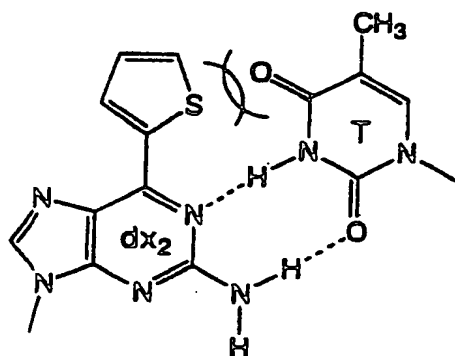
c



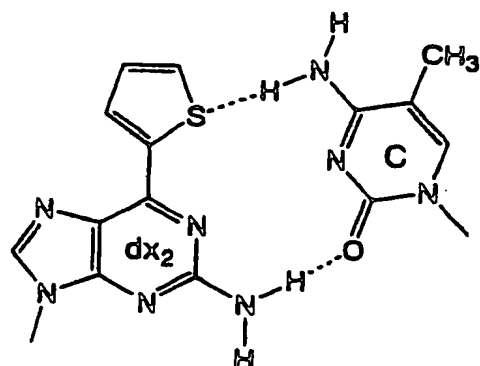
d



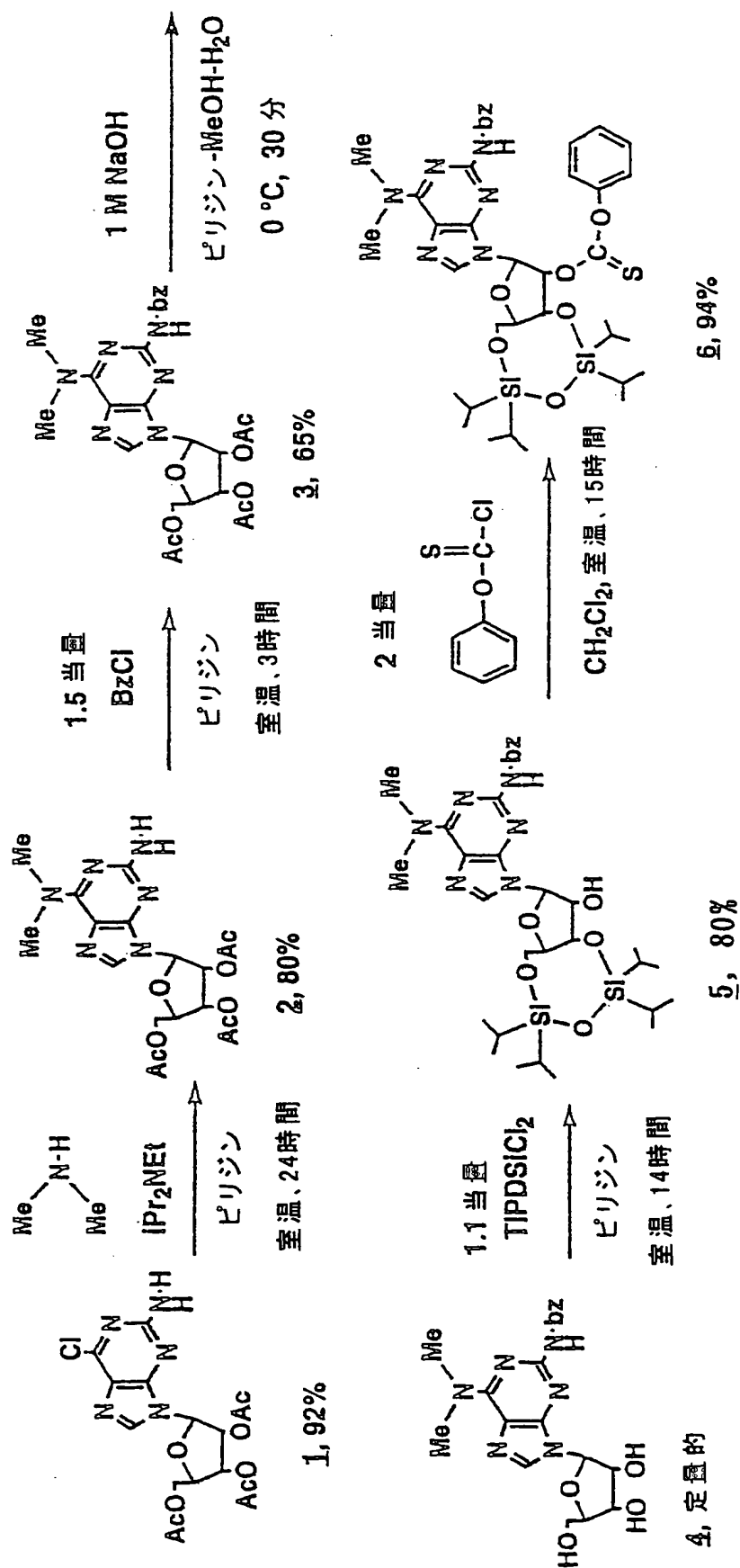
e

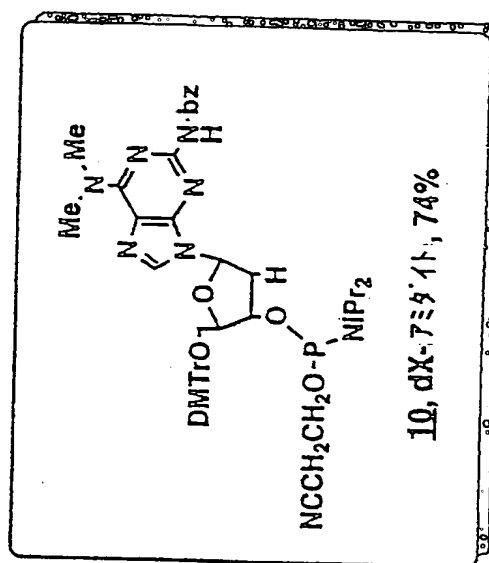
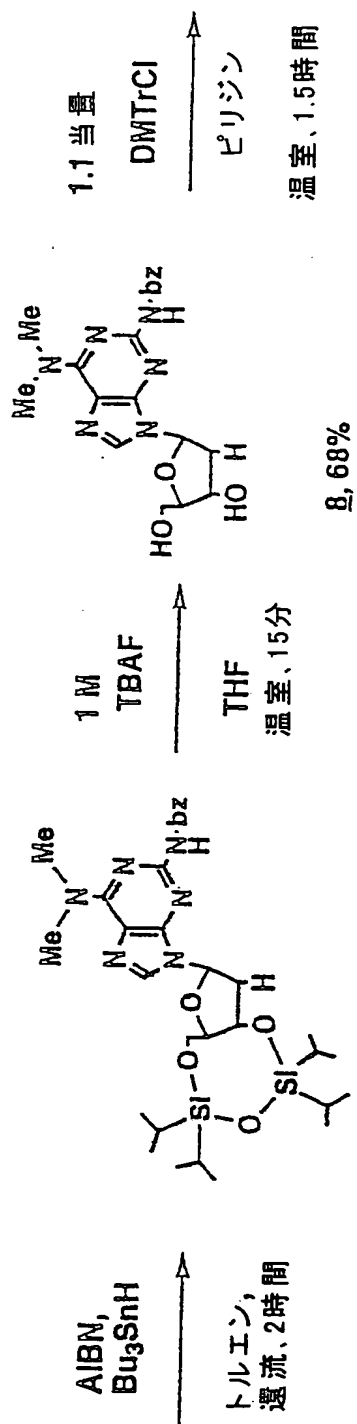


f

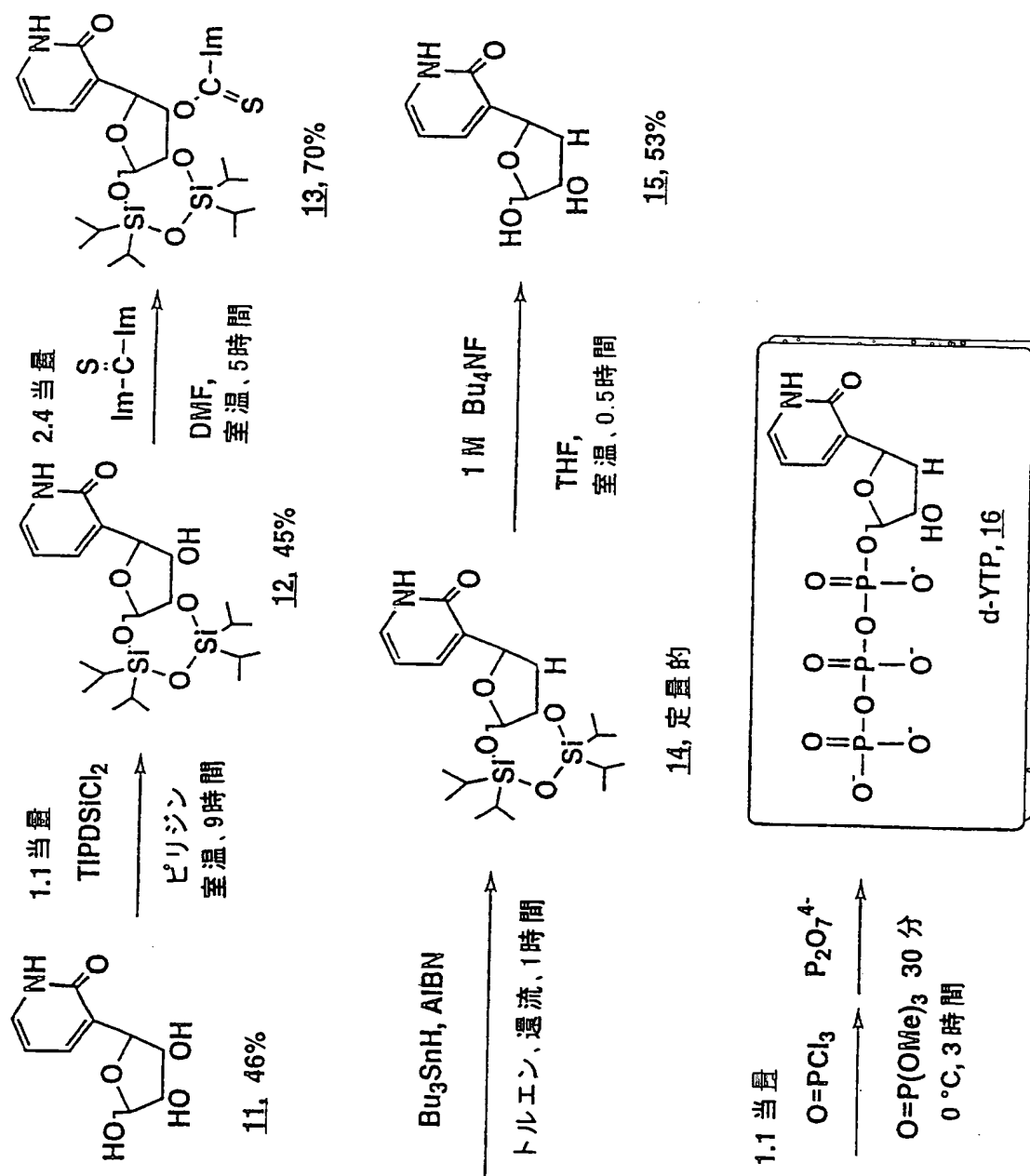


第 3 図

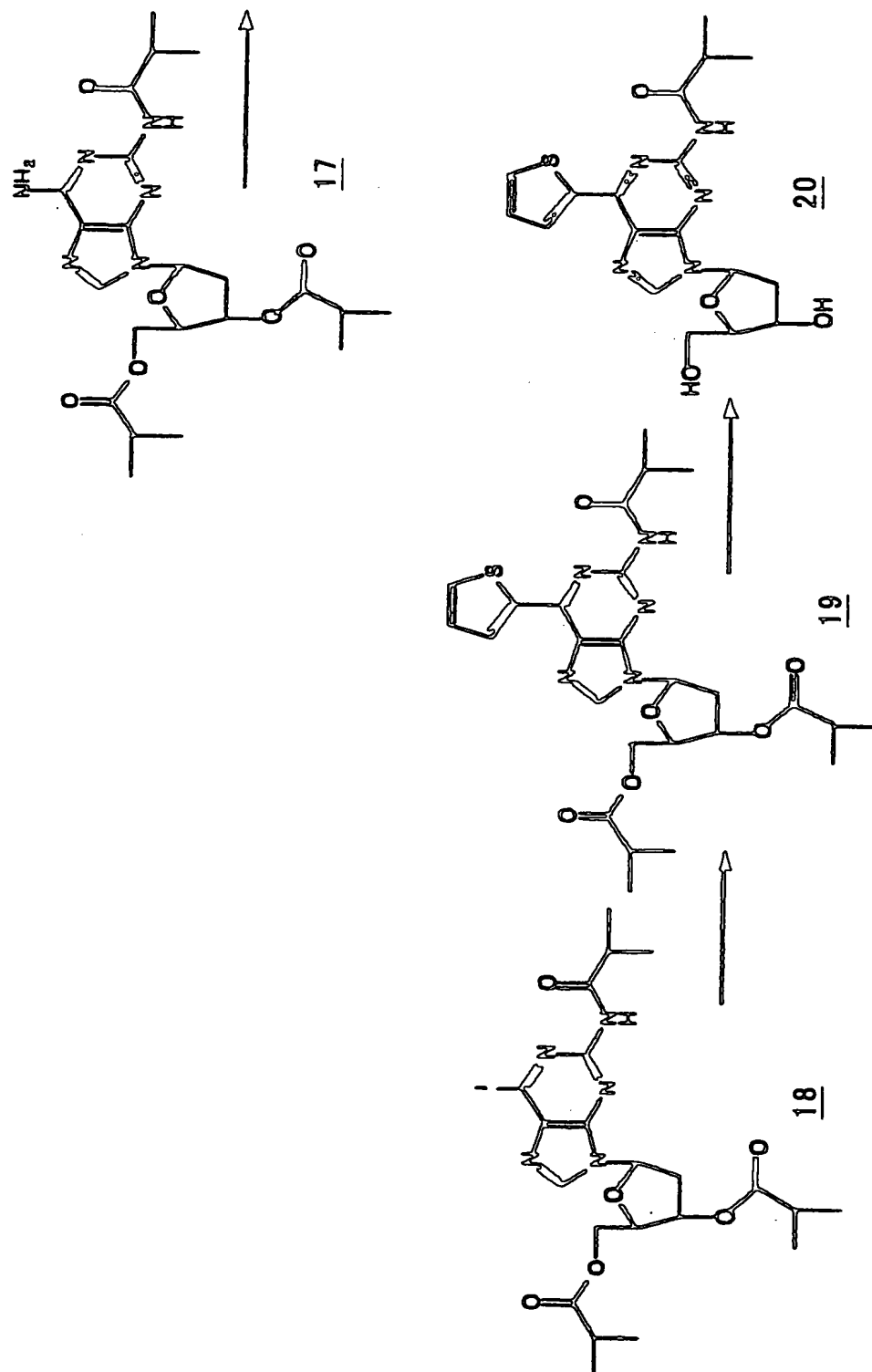


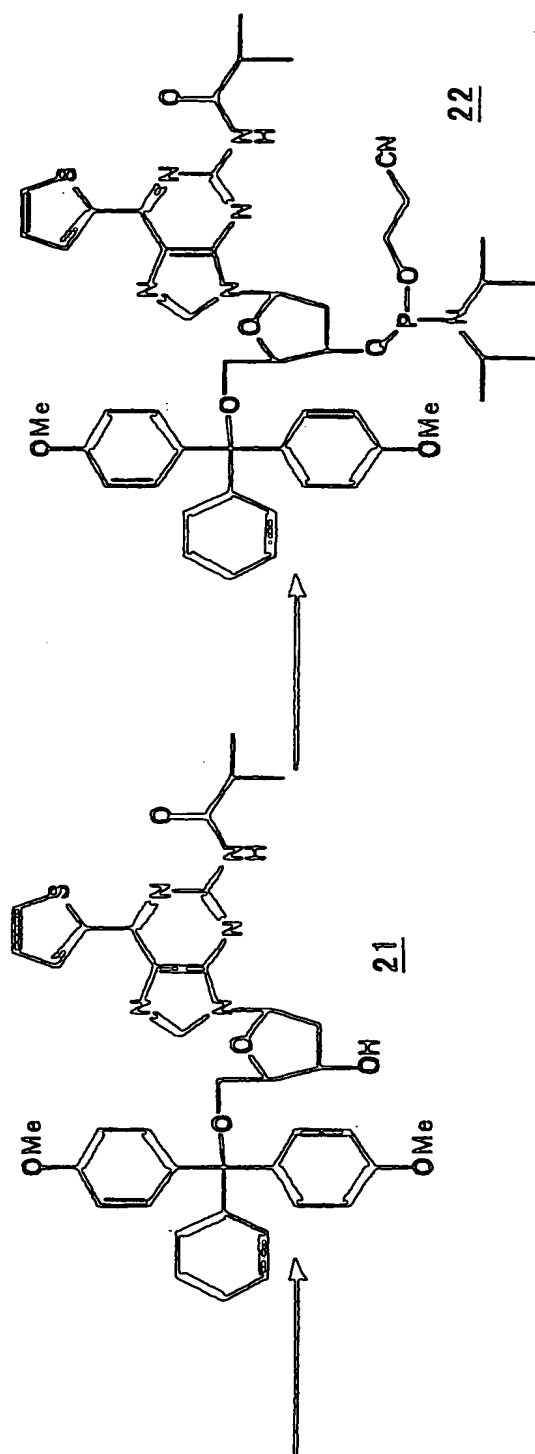


第 4 図

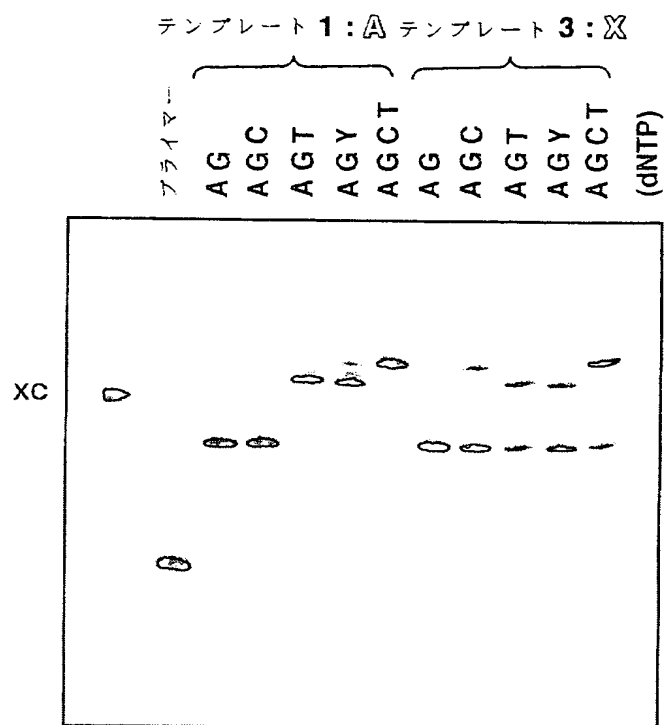


第 5 図

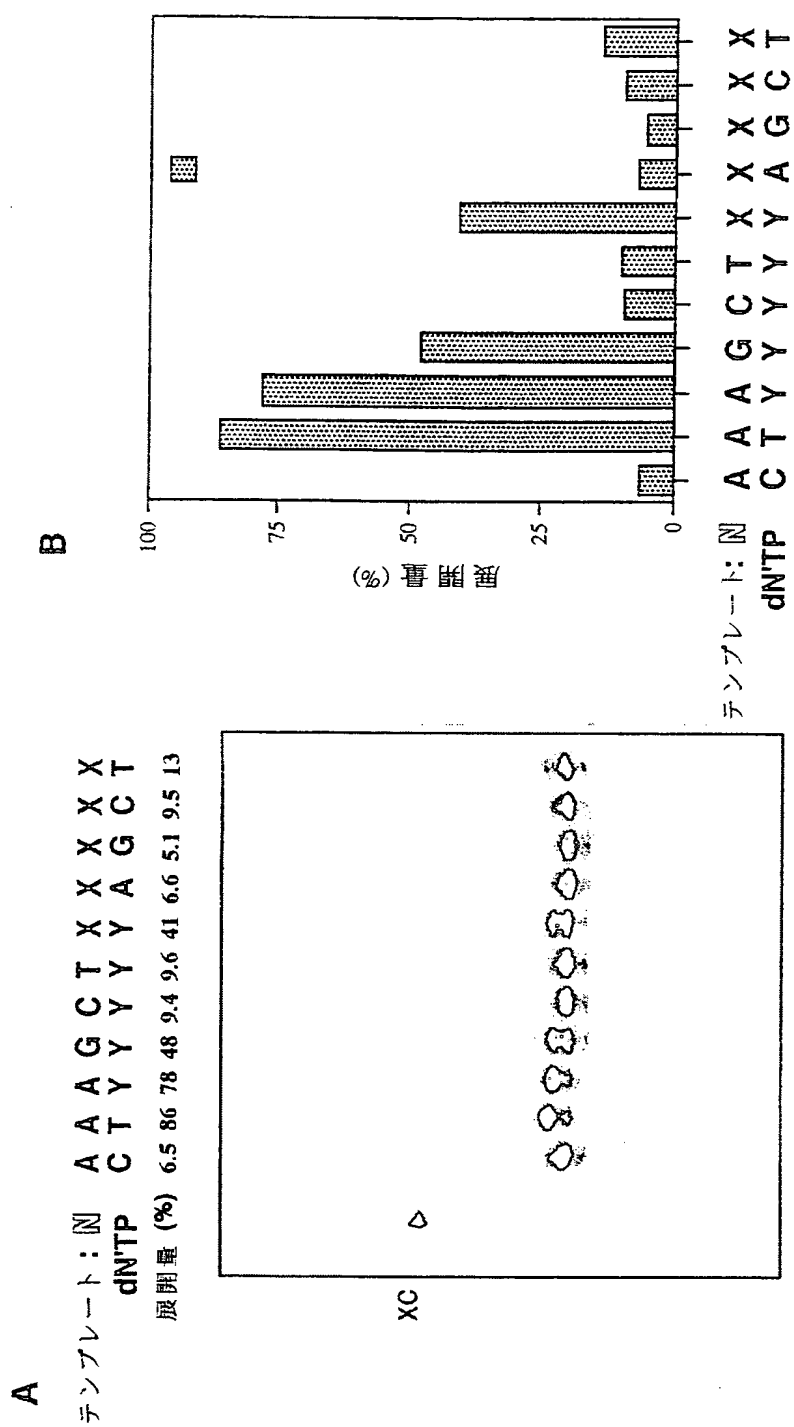


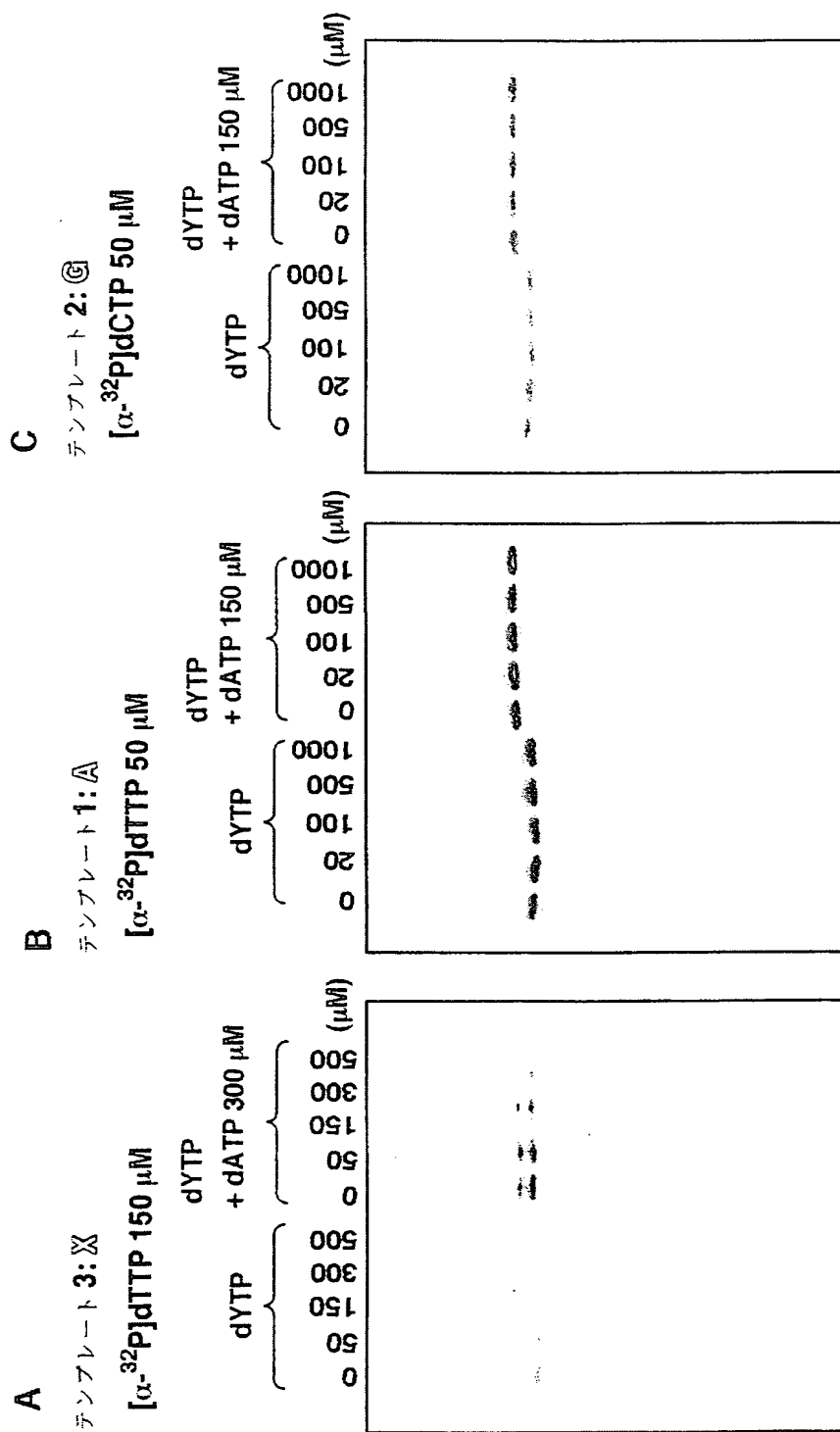


第 6 図

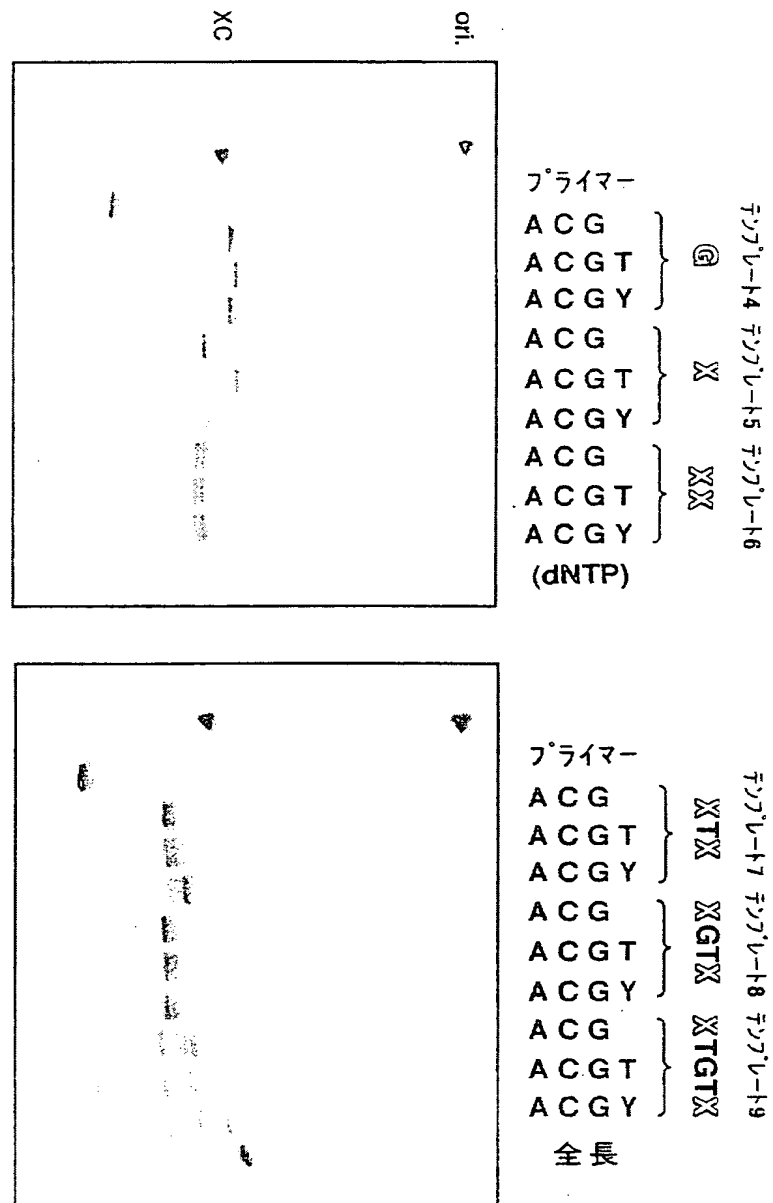


第 7 図

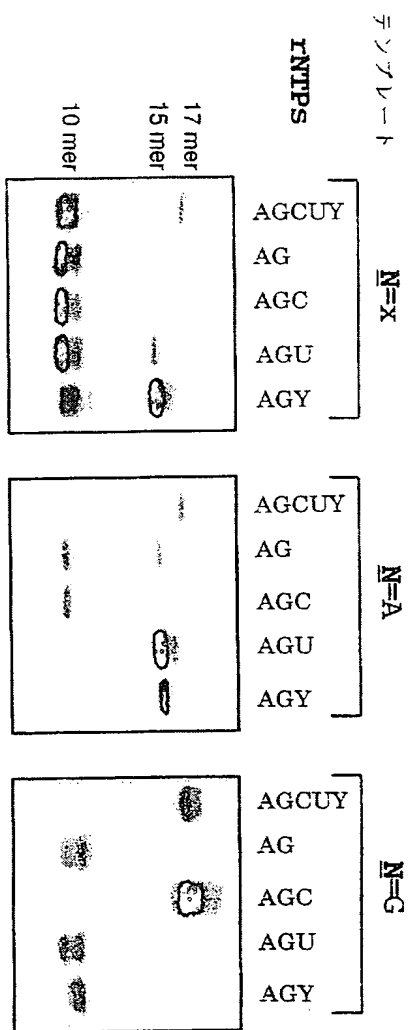




第 9 図



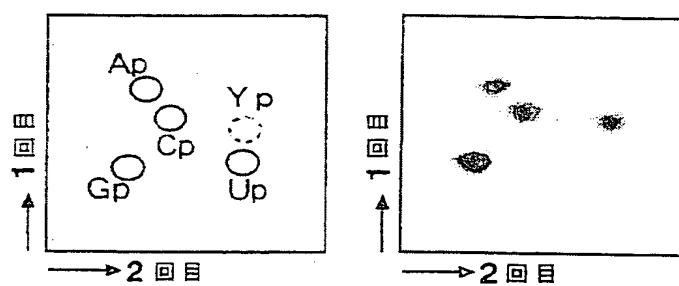
第 10 図



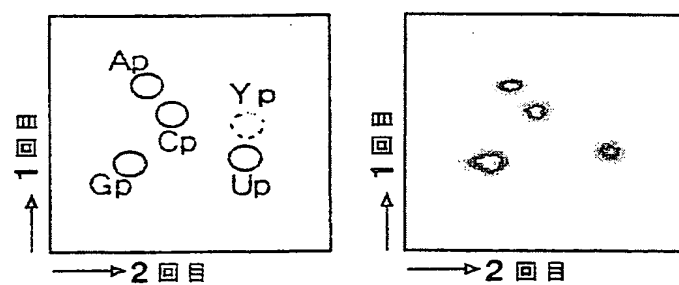


第 11 図

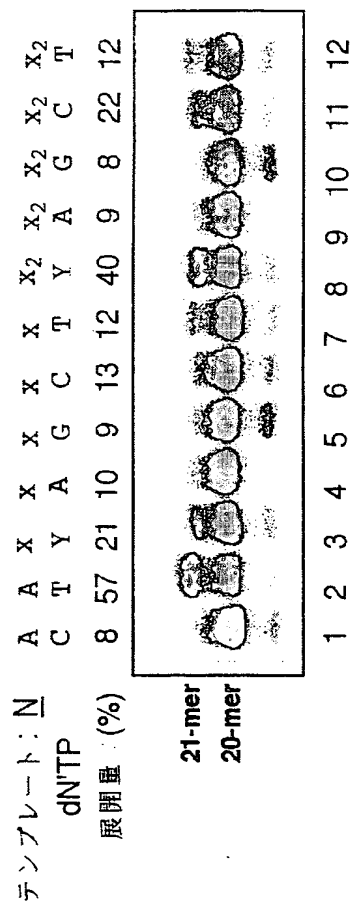
A



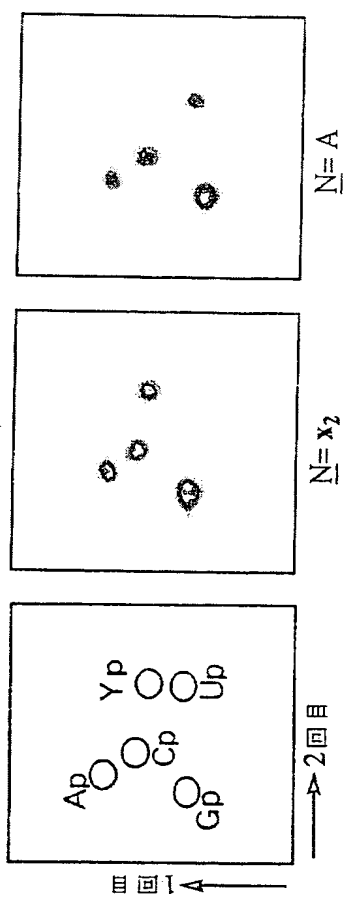
B



第 1 2 図



第 1 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04720

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07H21/00-04, C12N15/00-90,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MASAHIDE ISHIKAWA, et al., "Synthesis of 3-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair", Tetrahedron Letters, Vol.41, No.20 (21 May, 2000), pp.3931-3934	1-3, 9-15, 17-20, 22-26, 30, 33, 34
PA		4-8, 16, 21, 27-29, 31, 32, 35-40
X	MARJORIE S.SOLOMON, et al., "Chemical Synthesis and Characterization of Duplex DNA Containing a New Base Pair: A Nondisruptive, Benzofused Pyrimidine Analog", J. Org. Chem., Vol.58 (1993) pp.2232-2243	18, 22-26
A		1-17, 19-21, 27-40
A	JOHANNES J. VOGEL, et al., "Nonstandard Hydrogen Bonding in Duplex Oligonucleotides. The Base Pair between an Acceptor-Donor-Donor Pyrimidine Analog and a Donor-Acceptor-Acceptor Purine Analog", J. Am. Chem. Soc., Vol.116 (1994) pp.6929-6930	1-40
A	JOSEPH A. PICCIRILLI et al., "Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet", NATURE, Vol.343 (04 JANUARY 1990) pp.33-37	1-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 October, 2000 (03.10.00)

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04720

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOPHIE HUSS, et al., "Synthesis of Various Branched Triribonucleoside Diphosphates by Site-Specific Modification of a Diphenylcarbamoyl-Protected Guanine Residue", J. Org. Chem., Vol.53 (1988), pp.499-506	20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07H21/00-04, C12N15/00-90,
C12N1/21, C12N5/10, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	MASAHIDE ISHIKAWA, et al., "Synthesis of 3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair", Tetrahedron Letters, Vol. 41, No. 20 (May 21, 2000) p. 3931-3934	1-3, 9-15, 17-20, 22-26, 30, 33, 34
P A		4-8, 16, 21, 27-29, 31, 32, 35-40

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.10.00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P

9282


電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	MARJORIE S. SOLOMON, et al., "Chemical Synthesis and Characterization of Duplex DNA Containing a New Base Pair: A Nondisruptive, Benzofused Pyrimidine Analog", J. Org. Chem., Vol. 58 (1993) p. 2232-2243	18, 22-26 1-17, 19-21, 27-40
A	JOHANNES J. VOEGEL, et al., "Nonstandard Hydrogen Bonding in Duplex Oligonucleotides. The Base Pair between an Acceptor-Donor-Donor Pyrimidine Analog and a Donor-Acceptor-Acceptor Purine Analog", J. Am. Chem. Soc., Vol. 116 (1994) p. 6929-6930	1-40
A	JOSEPH A. PICCIRILLI, et al., "Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet", NATURE, Vol. 343 (4 JANUARY 1990) p. 33-37	1-40
A	SOPHIE HUSS, et al., "Synthesis of Various Branched Triribonucleoside Diphosphates by Site-Specific Modification of a Diphenylcarbamoyl-Protected Guanine Residue", J. Org. Chem., Vol. 53 (1988) p. 499-506	20

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903589

原本（出願用） - 印刷日時 2000年07月13日（13.07.2000）木曜日 16時07分56秒

0	受理官庁記入欄 国際出願番号.	
0-1		
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.10.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	JA903589
I	発明の名称	新規な核酸塩基対
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	科学技術振興事業団
II-4en	Name	Japan Science and Technology Corporation
II-5ja	あて名:	332-0012 日本国 埼玉県 川口市 本町四丁目1番8号
II-5en	Address:	1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-I	その他の出願人又は発明者	
III-I-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-I-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-I-4ja	氏名 (姓名)	平尾 一郎
III-I-4en	Name (LAST, First)	HIRAO, Ichiro
III-I-5ja	あて名:	351-0036 日本国 埼玉県 朝霞市 北原2-7-9-403
III-I-5en	Address:	2-7-9-403, Kitahara Asaka-shi, Saitama 351-0036 Japan
III-I-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-I-7	住所 (国名)	日本国 JP



特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903589

原本（出願用） - 印刷日時 2000年07月13日（13.07.2000）木曜日 16時07分56秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	石川 正英
III-2-4en	Name (LAST, First)	ISHIKAWA, Masahide
III-2-5ja	あて名:	351-0105 日本国 埼玉県 和光市
III-2-5en	Address:	西大和団地 4-10-306 4-10-306, Nishiyamatodanchi Wako-shi, Saitama 351-0105 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja	氏名(姓名)	藤原 健志
III-3-4en	Name (LAST, First)	FUJIHARA, Tsuyoshi
III-3-5ja	あて名:	351-0114 日本国 埼玉県 和光市
III-3-5en	Address:	本町 25-17 モトハシフラワー 2F 2F, Motohashifurawa 25-17, Honcho Wako-shi, Saitama 351-0114 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	
III-4-4ja	氏名(姓名)	横山 茂之
III-4-4en	Name (LAST, First)	YOKOYAMA, Shigeyuki
III-4-5ja	あて名:	113-0023 日本国 東京都 文京区
III-4-5en	Address:	向丘 1-20-6-607 1-20-6-607, Mukogaoka Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023 Japan
III-4-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-4-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903589

原本（出願用） - 印刷日時 2000年07月13日（13.07.2000）木曜日 16時07分56秒


IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	佐伯 憲生 SAEKI, Norio 103-0027 日本国 東京都 中央区 日本橋三丁目15番2号
IV-1-2en	Address:	高愛ビル 9階 9th floor, Taka-ai Building 15-2, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku, Tokyo 103-0027 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5205-2521
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5205-2522
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	CA JP US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年07月15日 (15.07.1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-201450
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-2-1	先の出願日	2000年05月02日 (02.05.2000)
VI-2-2	先の出願番号	特願2000-133519
VI-2-3	国名	日本国 JP
VI-3	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1, VI-2



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年07月13日（13.07.2000）木曜日 16時07分56秒

JA903589

VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	40	-
VIII-3	請求の範囲	3	-
VIII-4	要約	1	ja90358c.txt
VIII-5	図面	15	-
VIII-7	合計	63	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	なし	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名 (姓名)	佐伯 蔵生	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

JA903589

原本(出願用) - 印刷日時 2000年07月13日 (13.07.2000) 木曜日 16時07分56秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

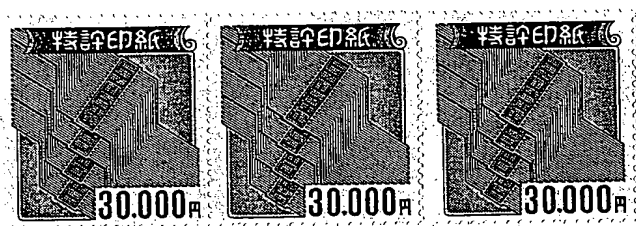
0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	受理官庁の日付印	
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.10.1999)
0-9	出願人又は代理人の書類記号	JA903589
2	出願人	科学技術振興事業団
12	所定の手数料の計算	金額/係数 小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒ 18,000
12-2	調査手数料 S	⇒ 72,000
12-3	国際手数料	
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,000
12-4	30枚を越える用紙の枚数	33
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100
12-6	合計の手数料 b2	36,300
12-7	b1 + b2 = B	82,300
12-8	指定手数料	
	国際出願に含まれる指定国 数	4
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	4
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	9,900
12-11	合計の指定手数料 D	39,600
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-14,200
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒ 107,700
12-14	優先権 証明書請求手数料	
	優先権 証明書を請求した 数	2
12-15	1優先権 証明書当た りの手数料 (X)	1,400
12-16	優先権 証明書請求手数料 の合計 P	⇒ 2,800
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒ 200,500
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権 証明書請求手数料: 特許印紙

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 注釈	1 0 2 6 6 弁理士 佐伯 慧生
--------	----------------	---------------------

13-2-1	EASYによるチェック結果 願書	Green? 発明の名称はできるだけ大文字で入力してください。
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 英文表記での名称はできるだけ大文字で記入してください。
		Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

JA903589



送付手数料・調査手数料 90,000円

ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。

 東京三菱銀行

年月日	取扱店番	お取引内容
120714	0022	お振込
受付通番	銀行番号	支店番号
1106	0022	0632671
時刻	税込手数料	お取引金額
10.21	¥210★	¥107,700★
お取扱いて ない場合	残高	
お取扱金額 *****		
ご案内	*****	
お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミトツキヨシムシヨ サエキ ノリ オ様 電 話 0352052521		



基本手数料	82,300円
指定手数料	39,600円
PCT-EASYによる料金の減額	-14,200円
合 計	107,700円



委 任 状

2000年 4月 26日

私儀 弁理士 佐伯 憲生 氏 を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「新規な核酸塩基対」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取下げる件

4. 上記事項に関する復代理人の選任及び解任

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 川 崎 雅 弘



委 任 状

2000年 5月 19日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯 憲生 氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「新規な核酸塩基対」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件



3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取り下げる件

あて名 埼玉県朝霞市北原 2-7-9-403

氏 名 平尾 一郎

あて名 埼玉県和光市西大和団地 4-10-³⁰⁶~~403~~

3字削除、3字挿入

氏 名 石川 正英



あて名 埼玉県和光市本町 25-17 モトハシフラワー 2F

氏 名 藤原 健志



あて名 東京都文京区向丘 1-20-6-607

氏 名 横山 茂之



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 殿

1. 出願番号 平成11年特許願第201450号

2. 請求人

識別番号 100102668

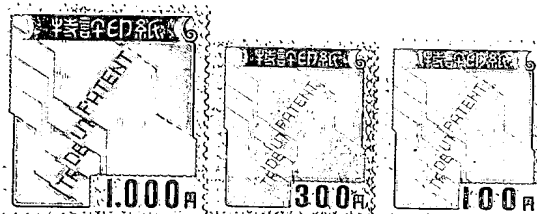
住 所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号
高愛ビル 9階

氏 名 弁理士 佐伯 憲 生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,400円)

優先権証明願 (P C T)

特許庁長官 殿



1. 出願番号 特願 2000-133519号

2. 請求人

識別番号 100102668

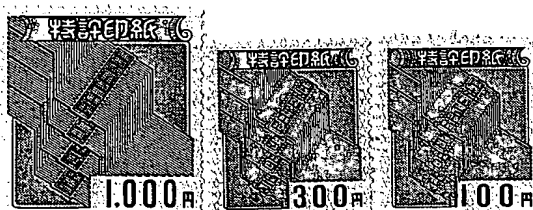
住 所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号
高愛ビル 9階

氏 名 弁理士 佐 伯 憲 生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,400円)



明 細 書

新規な核酸塩基対

技術分野

本発明は、立体障害を利用した選択的な新規人工核酸塩基対の形成に関する。

また、本発明は、本発明の新規人工核酸塩基対を使用した核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸に関する。より詳細には、本発明は、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成させることができる、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用した選択的な塩基対を形成させることができる新規な人工核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、これを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

背景技術

地球上の生物は、すべて遺伝子としてアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類の塩基からなる核酸を用い、AとT、GとCの特異的な塩基対形成によってその遺伝情報を伝えている。また、遺伝子DNAから転写されたmRNA中の遺伝情報に従ってタンパク質が合成される。その際、3塩基からなる64種類（ $4^3 = 64$ ）のコドンがそれぞれ20種類のアミノ酸に対応している。

もし、4種類（A、G、C、T）の既存の塩基に加えて新規な核酸塩基（X、Y）（ここでは、XとYが特異的に塩基対を形成する）を創製することができればコドンの種類が飛躍的に増大し（ $6^3 = 216$ ）、新たにできたコドン为非天然型アミノ酸に対応させることにより、非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成が可能となる（J. D. Bain, et al., Nature, 356, 537-539 (1992)）。

これまで、A-T及びG-C以外の人工塩基対として、イソシトシンとイソグアニンが報告されているが、イソグアニンの互変異性のためにイソシトシンより

もチミンと塩基対を形成し易い事が問題となっている (C. Switzer, et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 8322-8323 (1989); C. Y. Switzer, et al., Biochemistry, 32, 10489-10496 (1993).)。また、その他にもいくつかの新規塩基対の報告があるが、いずれもまだ、ポリメラーゼによる認識に問題があり実用化されていない (J. A. Piccirilli, et al., Nature, 343, 33-37 (1990); J. Horlacher, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6329-6333 (1995); J. C. Morales, et al., Nature struct. biol., 5, 954-959 (1998))。

ところで、様々な機能をもつ核酸分子がインビトロセレクション法によって見いだされているが (A. D. Ellington, et al., Nature, 346, 818-822 (1990); C. Tuerk, et al., Science, 249, 505-510 (1990))、前記した X-Y のような新規な塩基対が DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase)、RNA ポリメラーゼ (RNA polymerase) 及び逆転写酵素 (reverse transcriptase) の各種ポリメラーゼ (polymerases) に認識されれば、現在、4 種類の塩基で行われているインビトロセレクション法を 6 種類の塩基で行うことができ、4 種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製の可能性が期待できる。

また、遺伝子の 1 個又は 2 個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、新しい塩基対の創製が期待されている。

本発明者らは、天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を創製すべく鋭意研究してきたところ、立体障害を利用することにより天然の核酸との塩基対の形成を阻害することができ、新たにデザインされた核酸同士で選択的に塩基対を形成させ得ることを見出した。さらに、このようにデザインされた核酸が天然の各種ポリメラーゼに十分認識されることも見出した。

例えば、チミン (thymine) と塩基対を形成しないようにチミンの 6 位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2, 6-ジアミノプリン (2,6-diaminopurine) の 6 位のアミノ基に嵩高いメチル基を 2 つ導入した 2-アミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ) プリン (2-amino-6-(N,N-dimethylamino)purine) (この塩基を X という。) をデザインする。こうしてこの X は、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの 6 位のケト基を水素に変えた同族体ピリジノー

2-オン (pyridin-2-one) (この塩基を Y という。) などの塩基は、この X と塩基対を形成することができることを見出した (第 1 図参照)。

さらに、プリン環の 6 位に立体障害を起こし得るジメチルアミノ基を導入した 2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリン (2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)purine) (このものを、d X という。) を含む DNA オリゴマーと、3-(2'-デオキシ-5'-トリホスホロ-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン (3-(2'-deoxy-5'-triphosphoro-β-D-ribofuranosyl)pyridin-2-one) (このものを、d YTP という。) を化学合成し、d YTP あるいはそのリボヌクレオチド体 (r YTP) が、前記の d X の相補鎖として DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼによって選択的に DNA や RNA 中に取り込まれることを見出した。

しかし、このものは、第 2 図の a 及び b に示されるように、この塩基 (第 2 図 a の d x) 中の 6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン (あるいはウリジン) (第 2 図 b 参照) やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、この立体障害が前後に存在する塩基にも影響を与えることから、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、Klenow フラグメントによる d YTP の取り込み効率は低く、d x に対するチミジン三リン酸 (dTTP) の取り込みを抑えるには充分ではなかった。

そこで、本発明者らは、立体障害だけでなく、塩基相互間の静電的な反発や、前後の塩基とのスタッキング作用を考慮した新たな人工の塩基対を検討しところ、選択性の優れた人工の塩基対を得ることができることを見出した。

発明の開示

本発明は、DNA ポリメラーゼなどのポリメラーゼによって塩基対が認識される際に、塩基対間の立体障害を利用して、より好ましくはさらに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせ、さらに好ましくは天然型の塩基との静電的な反発が利用でき得る塩基を選択することにより選択的に新規人工核酸塩基対が形成されうるという概念を提供するも

のである。

即ち、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を提供するものである。さらに、本発明は、これらの人工の核酸、それを含むコドン、核酸分子、非天然型の遺伝子、及びそれらの応用方法を提供するものである。

本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基、好ましくは核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものであり、また当該立体障害及び静電的な反発により、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、スタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させる方法に関する。

また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害を利用して選択的な塩基対を形成させる、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法に関し、より詳細には、当該立体障害の利用、好ましくは当該立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用により前後の塩基と安定に存在し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基、好ましくは核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させ得る核酸に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基、好ましくは当該立体障害及び静電的な反発を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらに好ましくはスタッキング作用を有する基により前後の塩基と安定に存在するためのものであり、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対

であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸、及びその製造方法に関する。

即ち、本発明は、天然の塩基を含有する核酸類と同様な挙動をすることができる新規な人工の核酸、及びこのような核酸をデザインする方法を開示するものであり、本発明の核酸は天然の核酸と同様な応用をすることができる。

したがって、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を用いた各種の応用に関する。

より詳細には、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個以上含有してなるコドンに関し、当該コドンは天然の核酸と同様にアミノ酸をコードすることができ、当該アミノ酸としては非天然型のアミノ酸であることもできる。また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子に関し、当該核酸分子は天然の核酸と同様に蛋白質をコードすることができ、また、当該核酸分子は天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持することもできる。このような核酸分子に各種のポリメラーゼ作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造することもでき、本発明はこのような相補鎖の製造方法にも関する。

また、天然の遺伝子の一部に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を導入又は置換することができ、したがって、本発明は天然の遺伝子に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法に関し、これらの導入又は置換を前記した本発明のコドン単位にて行うこともできる。

さらに、本発明は、前記した方法により得ることができる非天然型の遺伝子又は前記した本発明の核酸分子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法に関し、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を含有するコドンが非天然型のアミノ酸をコードするようにした場合には、天然の蛋白質の一部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質を製造することができる。

したがって、本発明の方法により天然の蛋白質の一部が、他の天然型又は非天然型のアミノ酸、好ましくは非天然型のアミノ酸に置換又はそれらが導入された

新たな蛋白質を製造する方法を提供するものであり、それにより天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることができ、本発明は天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法にも関する。

また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸（以下、単に本発明の核酸という。）を含有する非天然型の遺伝子で形質転換された微生物にも関する。

さらに、本発明の新規な塩基対は、天然の塩基と対を形成しないので、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病等の治療に有用であり、本発明は新規な塩基対又はその一方の塩基からなる医薬組成物を提供するものである。

本発明は、天然の核酸の塩基とは塩基対を形成せず、かつポリメラーゼに認識され得る人工の核酸を提供することであるが、従来の人工の核酸は水素結合の位置のみを変更しようとしたために天然の核酸の塩基との塩基対の形成を実質的に阻害することはできず、塩基対の選択性が十分ではなかった。本発明は、係る選択性を立体障害を起こす基、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入するという手法で解決したものであり、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成することができる最初の人工核酸を提供するものである。

したがって、以下で本発明を具体例に基づいてより具体的に説明してゆくが、これらの具体例は本発明をよりよく理解させるためのものであり、本発明がこれらの具体例に限定されるものでないことは前述した本発明の技術的思想から明らかである。

本発明の核酸における塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、好ましくない塩基との水素結合を阻害することができる程度のもので、核酸の塩基としての性質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でな

い箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、例えば、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、*t*-ブチル基などの低級アルキル基、好ましくは分枝した低級アルキル基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基からなる低級アルコキシ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたジ低級アルキルアミノ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたシリル基などが挙げられる。

このような立体障害を起こさせ得る基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

また、本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、塩基相互間の好ましくない水素結合を阻害することができる程度の立体障害を有する基で、静電的な反発を有する基で、かつスタッキング作用を有するための環状の π 電子系を有する基であって、核酸の塩基としての性質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でない箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基としては、平面構造を有する芳香複素環式基が好ましい。このような芳香複素環式基は、分子の平面方向において十分な立体障害を起こさせるだけの大きさを有し、異種原子による静電的な反発を起こさせることができ、そして芳香複素環式基の π 電子系によるスタッキング作用も期待することができる。

このような芳香複素環式基としては、より具体的には、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基が挙げられる。これらの芳香複素環式基は、縮合環式、多環式、又は単環式のいずれのものであってもよいが、立体的な大きさからは単環式のものが好ましい。また、これらの芳香複素環式基は必要により各種の置換基を有するものであってもよいが、立体的な制限や好ましくない水素結合が生起することから通常は大き

な置換基を持たないものが好ましい。このような置換基としては、水酸基、アミノ基、カルボニル基、炭素数 1 ～ 5 程度の低級アルキル基、低級アルコキシ基、低級アルキルアミノ基、ニトロ基などが挙げられる。

このような立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

また、本発明の核酸はポリメラーゼに認識され得る人工の核酸であり、ポリメラーゼとしては、いずれのポリメラーゼであってもよいが、好ましくは DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼが挙げられる。また、最近のポリメラーゼの構造解析の結果は、全てのポリメラーゼと核酸の相互作用が本質的に同じであることを示しており、本発明の塩基対の形成はポリメラーゼ反応の本質に関わるものであり、以下で具体的な説明で用いた DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼに限定されるものではなく、逆転写酵素などを含め全てのポリメラーゼにおいても利用することができる。

さらに、最近の分子の立体配置の解析方法や原子間距離の精密な測定方法などにより、核酸の立体配置が計算されるので、これらの結果に基づいて立体障害を起こし、かつ他の位置で相互の核酸の塩基が 1 個又は 2 個以上、好ましくは 2 個の水素結合をし得る塩基の化学構造をデザインすることができる。したがって、本発明は核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害、好ましくはさらにこれに加えて静電的な反発並びにスタッキング作用に基づいて人工の核酸をデザインする方法を包含するものである。本発明の塩基対のデザインに当たっては、ワトソン・クリック型塩基対によるデザインが通常であるが、フーグスティーン型塩基対によりデザインしてもよい。

本発明の核酸は、核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害に基づいてその化学構造がデザインされた人工の核酸であればよく、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成するものであればよい。好ましくは、これらの人工の核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得るものであり、ポリメラーゼの作用により天然の核酸と同様にその相補鎖が合成されるものが好ましい。

本発明の核酸は、通常の化学合成法によっても合成することができるが、この方法に限定されるものではない。化学的な合成法の例を第 3 図、第 4 図及び第 5

図に例示する。

本発明の核酸を、核酸の配列の中に組み込む方法としては、天然の核酸を組み込む通常の方法を又はこれに準じた方法により行うことができる。例えば、DNA合成装置による方法や、ポリメラーゼによる方法や、ポイントミューテーション技術などに準じて行うことができる。また、従来の天然の核酸と同様な標識化を行うこともできる。

したがって、本発明は遺伝子断片やプローブなどとして使用される核酸分子であって、前記した本発明の核酸を含有する核酸分子を包含する。本発明の核酸分子は1個又は2個以上の本発明の核酸を含有するものであり、1本鎖のものであっても2本鎖のものであってもよい。また、本発明の非天然型の遺伝子は、天然の遺伝子の一部又は全部を本発明の核酸で置換したもの、天然の遺伝子に本発明の核酸を1個又は2個以上を付加したもの、又はこれらを組み合わせたものが包含される。このような本発明の非天然型の遺伝子は、従来の天然型の遺伝子の改変と同様な方法又は従来の方法に準じた方法により行うことができる。

したがって、本発明の核酸分子や非天然型の遺伝子は、従来の天然型のものと同様にこれを適当なベクターに挿入して又はファージなどを用いて、適当な微生物を本発明の核酸を含有する遺伝子により形質転換することができる。

また、本発明の核酸を含む新たなコドンを設計することができる。例えば、本発明の新規な人工の核酸の塩基をX及びYとすると、XXY、XYX、YXXなどのこれらの塩基の組み合わせや、AXA、TYT、CGX、ATX、などの天然の核酸の塩基との組み合わせによるコドン进行を設計することができる。新たなコドンは、天然型のアミノ酸をコードさせることもできるし、また、非天然型のアミノ酸をコードさせることもできる。さらに、転写や輸送などの機能をコードさせることもできる。このように本発明は新規な人工の核酸を提供するのみならず、本発明の核酸を含む新たなコドンの設計による、全く新しい遺伝暗号の設計を可能とするものであり、新たな遺伝暗号の世界を提供するものである。

本発明の新たなコドンに応じたtRNA系を設計することにより、非常に多くのアミノ酸を利用可能とする新たな蛋白質合成システムを設計することができる。利用可能なアミノ酸はリボソームにおける蛋白質合成酵素系で利用できるもので

あればよい。したがって、本発明は前記した本発明のコドンをもちいた新たな蛋白質合成システムを提供するものでもある。

従来、天然の蛋白質中の一部のアミノ酸を非天然型のアミノ酸に置換したり、非天然型のアミノ酸を挿入することは極めて困難であったが、本発明の蛋白質合成システムによれば希望する位置のコドンの核酸を本発明の核酸に置換又は導入することにより、所望の非天然型のアミノ酸を含有する蛋白質を製造することが可能となる。そして、このようなアミノ酸の変更を行うことにより、蛋白質中の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることが可能となる。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の立体障害を利用新規人工核酸塩基対 (X-Y) を示すものである。第1図中のRは、2-デオキシ-β-D-リボフラノシル基を示す。

第2図は、立体障害による塩基対 (第2図a及びb) と、立体障害、静電的な反発及びスタッキング作用を利用した新規人工核酸塩基対 (X₂-Y) を示すものである。

第3図は、本発明の塩基Xを有する核酸のdXのアミダイト試薬の合成スキームを示すものである。

第4図は、本発明の塩基Yを有する核酸のdYTPの合成スキームを示すものである。

第5図は、本発明の塩基X₂を有する核酸のdx₂のアミダイト試薬の合成スキームを示すものである。

第6図は、5'末端を³²Pラベルしたプライマー1 (0.5 μM) 及びテンプレート1、3 (1 μM) と種々のdNTP (150 μM) を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動によって示すものである。反応は17℃で30分間行った。

第7図は、5'末端を³²Pラベルしたプライマー2 (1 μM) 及びテンプレート1、2、3 (2 μM) とdNTP (150 μM) を用いたクレノウフラグメントによるシングルヌクレオチド挿入反応を示すものである。反応は17℃で30分間行った。Aは20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動の図であり、

Bはその結果をグラフにしたものである。

第8図は、プライマー2及びテンプレート1、2、3と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ TTPあるいは $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTPを用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応のdYTPによる阻害実験を示すものである。

Aは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート3 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ TTP ($150\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、50、150、300及び500 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

Bは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート1 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ TTP ($50\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び1000 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で10分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

Cは、プライマー2 ($1\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート2 ($2\ \mu\text{M}$) と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ CTP ($50\ \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び1000 μM 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を 17°C で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300\ \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

第9図は、5'末端を ^{32}P ラベルしたプライマー3 ($0.33\ \mu\text{M}$) 及びテンプレート4、5、6、7、8、9 ($1\ \mu\text{M}$) と種々のdNTP ($150\ \mu\text{M}$) を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を示すものである。反応は 17°C で60分間行った。

第10図は、テンプレート1-3と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ rATPならびに種々のrNTPsを用いたT7RNAポリメラーゼによる転写反応によって生成したRNAを電気泳動で調べた結果である。

第11図は、すべてのrNTPを共存させて第10図と同様の転写を行い、生成したRNAを電気泳動で精製し、これをRNase T2によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元TLCで解析した結果である。

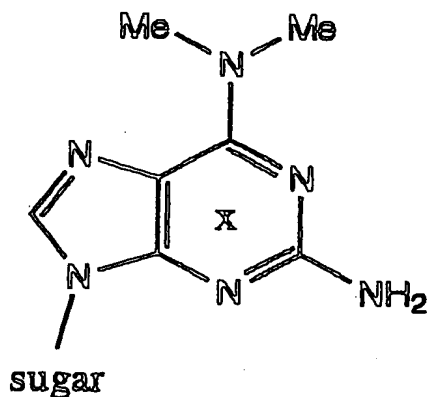
第12図は、本発明のX2塩基に対する各種の塩基の取り込み結果を示す、図面に代わる写真である。

第13図は、X2塩基を含有するテンプレートを用いて、すべてのrNTPを共存させたときに生成したRNAを電気泳動で精製し、これをRNase T2によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元TLCで解析した結果を示すものである。

発明を実施するための最良の形態

次の本発明を具体例により詳細に説明する。

人工の塩基のひとつである2,6-ジアミノプリンはチミンの6位のケト基と水素結合をし、チミンと塩基対を形成することがある。このものがチミンと塩基対を形成しないようにチミンの6位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2,6-ジアミノプリンの6位のアミノ基に嵩高いメチル基を2つ導入した次式で示される、



2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)プリン(以下、この塩基をXという。)をデザインした。

こうしてこのXは、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(以下、この塩基をYという。)

などの塩基は、このXと塩基対を形成することができた（第1図参照）。第1図の下段は、これらの塩基X及びYが他の塩基と対を形成できない様子を示している。

次に、塩基対X-Yの立体障害を利用した選択的な新規核酸塩基対形成を検証するために、DNAのプライマー伸長反応（Primer extension）法とDNAからRNAを合成する転写反応を用いた。プライマー伸長反応法とは、鋳型（template）となるDNAオリゴマーにプライマーとなるオリゴマーをアニーリングさせ、DNAポリメラーゼと2'-デオキシヌクレオシド-5'三リン酸（dNTP）を加えることにより、プライマーの3'末端にテンプレートの相補的な配列を伸長させるものである。転写反応は、DNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するものである。ここでは、DNAポリメラーゼの一つである大腸菌由来のDNAポリメラーゼIからその5'-エクソヌクレアーゼを取り除いたクレノウフラグメント（Klenow fragment）を、また、RNAポリメラーゼとしてはT7ファージ由来のT7 RNAポリメラーゼを用いた。どちらの酵素も現在最も良く用いられているものの一つである。

まず、鋳型となるDNAにXを組み込むため、dXのアミダイト試薬を化学合成し（第3図参照）、次に示す塩基配列を有するdXを含む鋳型DNA（Template 3、5、6、7、8、9）、また対照実験に用いる鋳型（Template 1、2、4）及び、それらのプライマー（Primer 1、2、3）を合成した。

dXを含む鋳型DNA（Template 3、5、6、7、8、9）

Template 3: dtgctctxtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 5: dagctxtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 6: dagctxxgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 7: dagctxixgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 8: dagctxtgxgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 9: dagctxtgtxtgtgtctccggtacaactaggc

対照実験に用いる鋳型（Template 1、2、4）

Template 1: dtgctctatcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 2: dtgctctgtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 4: dagctgtgtgtgtctccggtacaactaggc

プライマー (Primer 1、2、3)

Primer 1 : dcgactcactataggg

Primer 2 : dcatatagggaggaga

Primer 3 : dgcctagttgtaccg

また、基質となる d Y T P や r Y T P の合成も行った (第 4 図参照)。

ついで、プライマーの 5' 末端を T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (polynucleotide kinase) と $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ A T P を用いて ^{32}P ラベルした。 ^{32}P ラベルされたプライマー 1 ($0.5 \mu\text{M}$) 及びテンプレート 1、3 ($1 \mu\text{M}$) と種々の d N T P ($150 \mu\text{M}$) (N は種々の塩基を示す。) を用いて、クレノウフラグメント (0.2 ユニット/ μl) によるプライマー伸長反応を、 17°C で 30 分間行った。

この実験に用いたプライマーとテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート 1 を用いた場合:

Primer 1 : 5'- ^{32}p CGACTCACTATAGGG

Template 1: 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTATCTCGT

テンプレート 3 を用いた場合:

Primer 1 : 5'- ^{32}p CGACTCACTATAGGG

Template 3: 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTXTCTCGT

結果を 20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲルに電気泳動をし、それをイメージングプレート (Phosphoroimager analysis) を用いて分析した結果を第 6 図に示す。第 6 図の左側 5 個の A G、A G C、A G T、A G Y 及び A G C T はテンプレート 1 を用いた場合を、右側の 5 個はテンプレート 3 を用いた場合を示す。この結果、塩基 Y は A、G 及び X の相補鎖に取り込まれ、X の相補鎖には Y の他に C、T が取り込まれることがわかった (第 6 図参照)。

さらに、これらの取り込みを定量するため、5' 末端を ^{32}P ラベルしたプライマー 2 ($1 \mu\text{M}$) とテンプレート 1、2 及び 3 ($2 \mu\text{M}$) を用い、d N T P ($150 \mu\text{M}$) を 1 種類だけ加えて同様の実験を行った。

この実験に用いたプライマーとテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート 1 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²PCTATAGGGAGGAGA

Template 1: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTATCTCGT

テンプレート 2 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²PCTATAGGGAGGAGA

Template 2: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTGTCTCGT

テンプレート 3 を用いた場合 :

Primer 2 : 5' -³²PCTATAGGGAGGAGA

Template 3: 3' -TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTXTCTCGT

この結果を第 7 図の A 及び B に示す。この結果、Y は A、G 及び X の相補鎖にそれぞれ 78%、48% 及び 41% 取り込まれることがわかった。また、X の相補鎖には、Y、C 及び T がそれぞれ 41%、9.5% 及び 13% 取り込まれることがわかった (第 7 図参照)。

Y は単独では X だけでなく A や G にも取り込まれることがわかったので、次に、Y が T や C と共存するとき、それぞれの相補鎖に対してどちらが取り込まれやすいかを調べるために、以下のような競争実験を行った。

ラベルされていないプライマー 2 とテンプレート 3 をアニールさせ、これに [α -³²P] TTP と種々の量の dYTP を加え、 [α -³²P] TTP の X の相補鎖への取り込みが dYTP によって阻害されるかを調べた。また、同時に dATP も加えることにより、この阻害が X のつぎの T の相補鎖に対する A の取り込みにも影響するかを調べた (第 8 図の A 参照)。その結果、dYTP を [α -³²P] TTP とほぼ等量加えると [α -³²P] TTP の X の相補鎖への取り込みが 50% 阻害されることがわかった。同様の実験をテンプレート 1 及び 2 を用いて、A や G に対して行った結果、dYTP は [α -³²P] TTP の A の相補鎖への取り込み及び [α -³²P] CTP の G の相補鎖への取り込みに対しては全く阻害しないことがわかった (第 8 図の B (テンプレート 1)、C (テンプレート 2) 参照)。したがって、dYTP の A や G への取り込みは、TTP や dCTP 共存させることによって抑えられることがわかった。

また、鋳型上に X が 2 個あった場合に Y 及び C や T の X の相補鎖への取り込み

がどうなるかを調べるために、5'末端を ^{32}P ラベルしたプライマー3とテンプレート4、5、6、7、8及び9を用いてプライマー伸長反応法を行った。その結果、テンプレート上にXが連続して2つあるといずれの塩基を用いてもポリメラーゼ反応が2つのXの場所で停止してしまうことがわかった。2個のXの間に3つの別の塩基が挿入された場合のみ、Yだけが2個目のXの相補鎖にも取り込まれ、相補鎖合成が進むことがわかった（第9図参照）。

同様にXを含むDNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによる転写反応が進行するかも調べた。鋳型にテンプレート1-3を用い、この配列上のプロモータ領域を2本鎖化して、 $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ を加えてT7 RNAポリメラーゼによる転写反応を行った。

この実験に用いたプライマー領域とテンプレートの組み合わせを次に示す。

テンプレート1-3を用いた場合：

Coding strand : 5'-ATAATACGACTCACTATAGGG

Template 1-3 : 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTNTCTCGT

(テンプレート1 : N = A、

テンプレート2 : N = G、

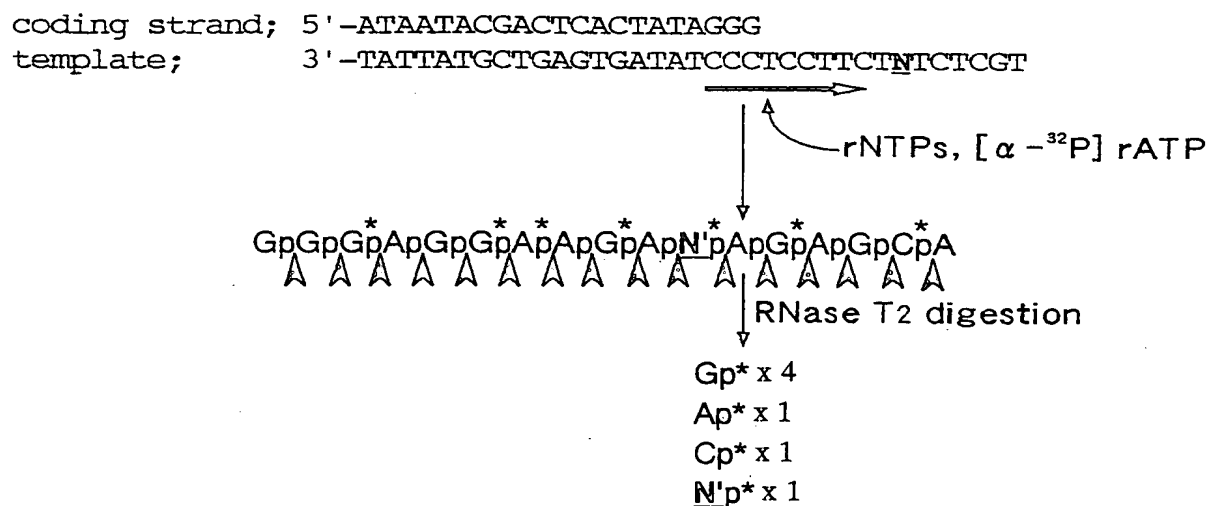
テンプレート3 : N = X)

この結果を第10図に示す。テンプレート3 (N = X) の場合には、Xに対してYが選択的に取り込まれた生成物に相当するバンドが電気泳動上で認められた。ただし、Uも僅かながら取り込まれている。テンプレート1 (N = A) の場合には、Aの相補鎖にUだけでなく、Yも取り込まれてしまうことが分かった。テンプレート2 (N = G) では、Cのみが取り込まれ、Yの取り込みによる生成物はほとんど認められなかった。

次に全てのrNTPが共存する際の転写反応を行った。先の実験と同様にテンプレート1 (N = A) 及び3 (N = X) を用い $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ を加えてT7 RNAポリメラーゼによる転写反応を、rATP 2 mM、rGTP 2 mM、rCTP 2 mM、UTP 2 mM、及びrYTP 1 mMの条件で行い、次いでRNase T2により生成した全長のRNAを完全分解し、3'端が標識されたヌクレオ



チドを2次元TLCで分析した。この実験の概要を次の式で示す。



この結果を第11図に示す。第11図中の丸で囲んだスポットはUVで観測されたスポットであることを示す。第11図のAはテンプレート3 (N=X) の場合の結果を示し、第11図のBはテンプレート1 (N=A) の場合の結果を示す。それぞれの場合の各塩基の理論値と実測値を次の表1に示す。

表1 各テンプレートを用いた場合の塩基の理論値と実測値

塩基	テンプレート3 (N=X)		テンプレート1 (N=A)	
	理論値	実測値	理論値	実測値
G p	4	4	4	4
A p	1	1.05	1	0.92
C p	1	0.94	1	0.78
U p	0	0.08	1	0.98
Y p	1	0.82	0	0.04

この結果、テンプレート3 (N=X) の転写反応では、Xに対してYがほぼ選



択的に取り込まれていて、Uは微量ながらわずかに検出された。また、テンプレート1 (N=A) の場合には、Yは全く取り込まれていなかった。

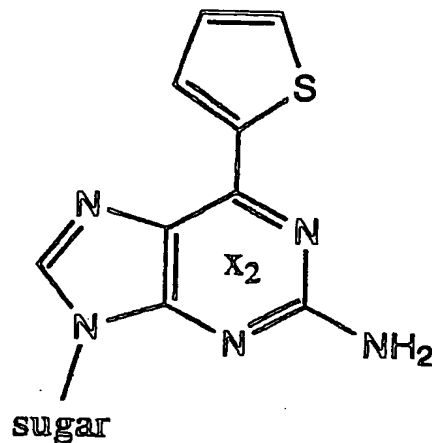
以上のように、このようにデザインされた塩基Xは、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(塩基Y)などの塩基は、このXと塩基対を形成することができ(第2図a及びb参照)、塩基対X-Yの選択的な核酸塩基対の形成が検証された。

しかし、このdx中の6-ジメチルアミノ基はその立体的なかさ高さによって、天然型塩基のチミン(あるいはウリジン)(第2図b参照)やシトシンとの塩基対をある程度排除することが出来たが、同時に塩基間のスタッキング等にも不利な影響を及ぼし、KlenowフラグメントによるdYTPの取り込み効率は低く、dxに対するチミジン三リン酸(dTTP)の取り込みを十分に抑えることが出来なかった。

そこでこのジメチルアミノ基の代わりに塩基間のスタッキングには悪影響を及ぼさず、塩基対平面にのみその立体障害を引き起こさせるために平面構造を有する芳香族系の置換基をdxの6位に導入することを行った。

この実験に当たって、その一例として6位にチオフェンを導入した次式で示される、





2-アミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリン (dx2: この新しい塩基をX2とし、先の2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリンをdxとする) の合成を行い、この塩基を含む鋳型に対するdYTPやrYTPの取り込みを調べた。

鋳型DNA合成用のdx2のアミダイト試薬の調製法の概要を第5図に示した、詳細は実施例2を参照されたい。このアミダイト試薬は、DNA合成において通常の市販のアミダイト試薬と同様のカップリング収率を示した。

まず、Klenowフラグメント (exo+) を用いて、鋳型中のdx2に対するdYTPの取り込みを調べた (実施例10参照)。

テンプレート及びプライマーとして次の塩基配列のものを使用した。

プライマー 5'-³²pACTCACTATAGGGAGGAAGA-

テンプレート 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCT-N-TCTCGT

テンプレートのNの箇所に本発明の塩基X、塩基X2及び対照としてAの塩基を結合させて各種の塩基の取り込み実験を行った。結果を第12図に示す。第12図にレーン1及び2は対照として使用したアデニン(A)におけるシトシン(C)とチミン(T)の取り込みを示している。

この結果、先のdxに対するdYTPの取り込み効率は21% (レーン3) で

あったが、 $d x 2$ を用いることにより40%（レーン8）まで取り込み効率が上昇した。同条件での天然型の $d A$ に対する $d T T P$ の取り込み効率が57%（レーン2）であることと比較すると、 $d x 2$ によりかなりの改善が見られたことになる。 $d x$ に比べて $d x 2$ は、 $d C T P$ の取り込みが大きくなっている（22%）（レーン11）が、それでも $d Y T P$ の取り込み（40%）に比べるとそれほど大きな値であるということとはできない。

このKlenowフラグメント（ $e x o^+$ ）による実験の結果から、先の $d x$ から $d x 2$ を用いることにより、 $d x 2$ に対する $d C T P$ の取り込み効率が上昇したが、これは、シトシンの4-アミノ基と $d x 2$ 中のチオフェンの硫黄原子との相互作用によるものと思われる（第2図f参照）。また、このように $d x 2$ 中のチオフェンの硫黄原子が塩基対面に向いたときは、チミン（T）の4-ケト基と静電的な反発が予想され、これは、塩基対の形成を阻害する要因として、立体的な障害に加えて、静電的な反発（第2図e参照）を用いることができることを示している。これらのことから、 $d x 2$ 中のチオフェンは、硫黄原子の側が塩基対面に向いていると考えられる。

次に、T7 RNAポリメラーゼによる鋳型中の $d x 2$ に対する $r Y T P$ のRNA中への取り込みを、次に示す反応、

5' ATAATACGACTCACTATAGGG
 template 3' TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTNTCTCGT

T7 RNA polymerase (2.5 units)
 rNTPs (N= A,G,C,U, and Y)
 10 mM rGMP
 [α - 32 P]rATP
 37 °C for 3h

r (GGG*AGG*A*AG*An*AG*AGC*A)

RNase T₂ (0.75 units)
 37 °C for 14 h

rGp* + rAp* + rCp* + rnp*
 4 : 1 : 1 : 1

によって調べた（実施例 1 1）。

この方法で製造された次の

G G G * A G G * A * A G A n * A G * A G C * A

（n はテンプレートの塩基 N に対応する塩基を示し、右肩のアスタリスクは標識化されていることを示す。）

塩基配列を有する RNA を、R N a s e T 2 で分解して、次いで 2 次元 T L C（セルロース樹脂）により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。

第 1 3 図にその T L C の展開図を示す。また、次の表 2 にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

表 2

template	rGp*	rAp*	rCp*	rUp*	rYp*
<u>N</u> = x ₂	3.982 (4)	1.052 (1)	0.950 (1)	0.047 (0)	0.969 (1)
<u>N</u> = A	3.939 (4)	1.035 (1)	0.995 (1)	1.032 (1)	not detected (0)

表 2 中のカッコ内は、理論値を示す。

この結果、d x 2 を用いても高い選択性で r Y T P が d x 2 に対してのみ取り込まれることがわかった。先の d x を鋳型に用いた場合にも良い結果が既に得られていたが、同様の条件で d x 2 を鋳型に用いて転写反応を行い、d x 2 に対して RNA 中に取り込まれたヌクレオチドの組成分析を行っても、同様に高い選択性で r Y T P が d x 2 に対してのみ取り込まれたことになる。

以上のように、本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な塩基対の形成を提供するものである。そして、本発明は、このような選択的な塩基対の形成を、塩基の立体障害、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用することによって実現できることを明らかにするものである。前記の各種の実験に使用した塩基は、本発明を例示するものであり、そして選択的な人工の塩基対を形成させるために必要な前記した本発明の考え方が正しいことを実証するものである。したがって、本発明は前記で例示した具体的な塩基に限定されるものではなく、本発明の考え方に基づいて生成される塩基対を全て包含できるものである。

さらに本発明の塩基対は天然の合成酵素類に認識され得るものであることも前記で示したように実証され、天然の DNA や RNA などの合成、転写などの系において天然のものと同様に核酸の複製、転写などがおこなわれ得るものであるものである。したがって、本発明は、天然の遺伝子の機能発現のシステムにおいて、そのまま適用可能な新規な人工塩基対を形成させるためのコンセプトを提供するものであり、本発明の塩基を用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できることが示され、天然の遺伝子のシステム

に応用できるだけでなく、天然の遺伝子のシステムの機能や作用の解明のために応用することも可能である。

実施例

以下に実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

実施例 1 : 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-[[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ]ホスフィノ]-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル]プリン (2-Benzamino-6-(N,N-dimethylamino)-9-[5'-O-dimethoxytrityl-3'-O-[[(diisopropylamino)-2-cyanoethoxy]phosphino]-2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl]purine) (10) の合成 (第3図参照)

(A) 2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2',3',5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン(2)の合成

2-アミノ-6-クロロ-9-(2',3',5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン(1) (M. J. Robins and B. Uznanski, Can. J. Chem., 59, 2601-2607 (1981).) (18.6 mmol, 7.96 g)を、無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(180 ml)に溶解し、室温で攪拌したところへ、ジメチルアミン塩酸塩(55.8 mmol, 4.55 g)、ジイソプロピルエチルアミン(74.4 mmol, 12.9 ml)を加え、室温で15時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残渣にクロロホルムを加え、有機層を水で3回、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回、10%クエン酸水溶液で2回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残渣がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製し、目的物(2)を5.42 g (12.4 mmol) (67%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 7.56 (s, 1H, H8),

6.02 (d, 1H, H1', J = 5.0 Hz), 5.95 (dd, 1H, H2', J = 5.0 Hz),
5.79 (t, 1H, H3', J = 5.0 Hz), 4.69 (s, 2H, 2-NH₂),
4.42-4.45 (m, 1H, H4'), 4.34-4.40 (m, 2H, H5', H5''),
3.43 (br, 6H, N-CH₃), 2.13, 2.10, 2.08 (s, 3H, Ac).

(B) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-β-D-リボフラノシル)プリン(3)の合成

前記(A)で得た化合物(2)(10 mmol, 4.36 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(180 ml)に溶解し、室温で攪拌したところへ、塩化ベンゾイル(15 mmol, 1.74 ml)を加え、室温で14時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残渣にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残渣がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサネジクロロメタン)で精製し、目的物(3)を3.53 g (6.53 mmol) (65%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H, H8),
7.96 (d, 2H, Bz-m, J = 10.0 Hz), 7.75 (s, 1H, NHBz),
7.55 (dd, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5),
6.08 (d, 1H, H1', J = 3.0 Hz), 5.96-6.01 (m, 2H, H2', H3'),
4.39-4.50 (m, 3H, H4', H5', H5''), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
2.15 (s, 3H, Ac), 2.10 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac).

(C) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(β-D-リボフラノシル)プリン(4)の合成

前記(B)で得た化合物(3)(6.53 mmol, 3.53 g)にピリジン-メタノール-水(65:30:5) 50 mlを加え、氷浴中で攪拌したところへ、2M水酸化ナトリウム-ピリジン-メタノール-水(65:30:5)溶液 50 mlを加え、氷浴中で15分間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に塩化アンモニウム(5.21g)

を加え 40 ml になるまで減圧濃縮した。その溶液にクロロホルムを加え、有機層を抽出し、水層をクロロホルム-ピリジンで 2 回抽出した後、有機層を集め硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を 10 ml になるまで減圧濃縮し、そこにトルエンを加え減圧濃縮すると結晶が析出した。結晶を濾取し、減圧下 90℃で乾燥し、目的物 (4) を 2.87 g 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.28 (s, 1H, H8),
7.92 (dd, 2H, Bz-m, $J = 7.0$ Hz), 7.57 (dd, 1H, Bz-p, $J = 7.3$ Hz),
7.49 (t, 2H, H Bz-o, $J = 7.5$), 5.91 (d, 1H, H1', $J = 4.0$ Hz),
5.48 (d, 1H, OH, $J = 5.5$ Hz), 5.15 (d, 1H, OH, $J = 4.0$ Hz),
5.04 (t, 1H, OH, $J = 1.0$ Hz), 4.56 (t, 1H, H2', $J = 10.0$ Hz),
4.17 (d, 1H, H3', $J = 3.0$ Hz), 3.93 (d, 3H, H4', $J = 3.5$ Hz),
3.63-3.65 (m, 1H, H5'), 3.52-3.56 (m, 1H, H5''),
3.48 (br, 6H, N-CH₃).

(D) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(3', 5'-
-O-テトライソプロピルジシロキサニル- β -D-リボフラノシル) プリン
(5) の合成

前記 (C) で得た化合物 (4) (5.0 mmol, 2.07 g) を無水ピリジンで 3 回共沸脱水した後、無水ピリジン (50 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサン (5.5 mmol, 1.76 ml) を加え室温で 14 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (5) を 2.63 g (4.0 mmol) (80%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl₃) δ : 8.22 (s, 1H, H8),
7.89 (d, 2H, Bz-m, $J = 5.0$ Hz), 7.80 (s, 1H, NHBz),
7.55 (dd, 1H, Bz-p, $J = 7.5$ Hz), 7.48 (t, 2H, Bz-o, $J = 7.5$ Hz),

5.91 (s, 1H, H1'), 4.84 (dd, 1H, H3', J = 5.5 Hz),
4.50 (d, 1H, H2', J = 5.5 Hz), 4.07-4.20 (m, 2H, H4', H5'),
4.06 (d, 1H, H5'', J = 13.0 Hz), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
0.95-1.08 (m, 28H, iPr).

(E) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-オ-フェノキシチオカルボニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシル)プリン(6)の合成

前記(D)で得た化合物(5)(3.98 mmol, 2.61 g)を無水トルエンで3回共沸脱水した後、無水ジクロロメタン(40 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら1-メチルイミダゾール(7.96 mmol, 0.64 ml)とクロロチオ炭酸フェニル(5.57 mmol, 0.77 ml)を加え室温で16時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。有機層を抽出後、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、水で1回、10%クエン酸水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製し、目的物(6)を2.96 g(3.73 mmol)(94%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.17 (s, 1H, H8),
7.87 (d, 2H, Bz-m, J = 3.0 Hz), 7.79 (s, 1H, NHBz),
7.55 (t, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.47 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz),
7.41 (d, 2H, PhO-o, J = 7.5 Hz), 7.29 (t, 2H, PhO-m, J = 7.5 Hz),
7.13 (d, 1H, PhO-p, J = 10.0 Hz), 6.39 (d, 1H, H2', J = 5.0 Hz),
6.11 (s, 1H, H1'), 5.14-5.17 (m, 1H, H3'), 4.23-4.26 (m, 1H, H5'),
4.07-4.12 (m, 1H, H4', H5''), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
0.99-1.15 (m, 28H, iPr).

(F) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシル)プリン(7)の合成

前記 (E) で得た化合物 (6) (3.73 mmol, 2.96 g) を無水トルエンで 3 回共沸脱水した後、無水トルエン (88 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら 2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル (0.746 mmol, 122 mg) を加え、室温下アルゴンガスを 1 時間バブリングさせる。そこに、水素化トリブチルスズ (5.60 mmol, 1.51 ml) を加え 75℃ で 3.5 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (7) を 2.27 g (3.55 mmol) (95%) 得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.24 (s, 1H, H8),

7.90 (d, 2H, Bz-m, J = 5.0 Hz), 7.83 (s, 1H, NHBz),

7.54 (t, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz),

6.29 (dd, 1H, H1', J = 7.5 Hz), 4.80-4.83 (m, 1H, H3'),

3.97-4.07 (m, 2H, H5', H5''), 3.86-3.88 (m, 1H, H4'),

3.50 (br, 6H, N-CH₃), 2.68-2.71 (m, 1H, H2'),

2.59-2.63 (m, 1H, H2''), 1.03-1.09 (m, 28H, iPr).

(G) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリン (8) の合成

前記 (F) で得た化合物 (7) (3.55 mmol, 2.27 g) を 1 M テトラブチルアンモニウムフロライド-テトラヒドロフラン溶液 (14 ml) に加え、室温で 15 分間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をクロロホルムに溶解し、少量の水で洗った後、水層をクロロホルムで 4 回抽出し、有機層を集めて硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を減圧濃縮し、トルエンでピリジン臭のしなくなるまで共沸を繰り返す。残査をメタノールに溶解した。そこに少しずつジクロロメタンを加え結晶化させた。結晶を濾取し、減圧下乾燥し、目的物 (8) を 0.964 g (2.42 mmol) (68%) 得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.23 (s, 1H, H8),

7.84 (d, 2H, Bz-m, J = 7.5 Hz), 7.50 (t, 1H, Bz-p, J = 7.3 Hz),

7.42 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz), 6.25 (t, 1H, H1', J = 7.0 Hz),

5.21 (s, 1H, OH), 4.89 (s, 1H, OH), 4.33 (s, 1H, H3'),
3.77 (s, 1H, H4'), 3.50-3.53 (m, 1H, H5'), 3.43-3.46 (m, 1H, H5''),
3.48 (br, 6H, N-CH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, H2'),
2.16-2.18 (m, 1H, H2'').

(H) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)プリン(9)の合成

前記の(G)で得た化合物(8)(1.47 mmol, 0.585 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水した後、無水ピリジン(10 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら4, 4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.61 mmol, 547 mg)を加え室温で1.5時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮する。残査がピリジン臭がなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール 0.5%トリエチルアミン)で精製し、目的物(9)を0.99 g (1.41 mmol) (96%)得た。

¹H-NMR (270.16 MHz, CDCl₃) δ: 8.20 (s, 1H, H8), 7.79 (s, 1H, NHBz),
7.77 (d, 2H, Bz-m, J = 1.4 Hz), 7.76 (d, 1H, Bz-p, J = 3.5 Hz),
7.14-7.51 (m, 11H, H Bz-o, DMTr), 6.72 (dd, 4H, DMTr),
6.45 (t, 1H, H1', J = 6.5 Hz), 4.78 (m, 1H, H3'),
4.14 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 3.50 (br, 6H, N-CH₃),
3.39-3.47 (m, 1H, -H5'), 3.30-3.33 (m, 1H, H5''),
2.80-2.85 (m, 2H, H2', H2'').

(I) 2-ベンズアミノ-6-(N, N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-[[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ]ホスフィノ]-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル]プリン(10)の合成

前記 (H) で得た化合物 (9) (0.864 mmol, 0.605 g) を無水ピリジンで 3 回、無水テトラヒドロフランで 2 回共沸脱水した後、無水テトラヒドロフラン (6 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら N, N-ジイソプロピルエチルアミン (2.59 mmol, 0.452 ml) とクロロ-2-シアノエトキシー-N, N-ジイソプロピル-アミノホスフィン (1.73 mmol, 0.385 ml) を加え室温で 2 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に無水メタノールを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え、有機層を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 1 回飽和食塩水で 3 回洗った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール 2% トリエチルアミン) で精製した後、少量のクロロホルムに溶解し、ヘキサンで再沈殿を行い、目的物 (10) を 0.574 g (0.638 mmol) (74%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270.16 MHz, CDCl_3) δ : 8.14 (s, 1H, H8), 8.13 (s, 1H, H8), 7.72 (s, 1H, NHBz), 7.65-7.70 (m, 2H, Bz-m), 7.16-7.47 (m, 12H, H Bz-p, o, DMTr), 6.70-6.75 (m, 4H, DMTr), 6.27-6.41 (m, 1H, H1'), 4.63-4.80 (m, 1H, H3'), 4.20-4.27 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH_3), 3.24-3.72 (m, 10H, H5', H5'', $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$, N-CH_3), 2.83-3.00 (m, 1H, H2'), 2.40-2.64 (m, 5H, H2'', $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 1.06-1.19 (m, 12H, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (109.36 MHz, CDCl_3) δ : 149.25.

実施例 2: 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-O-[(ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル]プリン (22) の合成法 (合成経路を第 5 図に示す。)

(A) 2-イソブチリルアミノ-6-ヨード-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ- O -イソブチリル- β -D-リボフラノシル)プリン (18) の合成

2-イソブチリルアミノ-6-アミノ-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ- α -イソブチリル- β -D-リボフラノシル)プリン(17) (Babara L. Gaffney, Luis A. Marky and Roger A. Jones, Tetrahedron, 40, 3-13 (1984)) 2.38 g (5 mmol) をアルゴン雰囲気下で60℃に加熱し、n-pentyl nitrite 13.5 ml (0.10 mol) とジヨードメタン25 ml (0.31 mol) を素早く加え懸濁した。この混合物を60℃でよく攪拌しながら200 Wハロゲンタングステンランプにより光源距離2 cmで可視光を3時間外部照射した。反応溶液に30 mlの飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加え室温で3時間攪拌した。その後120 mlの飽和亜硫酸ナトリウム水溶液と150 mlのクロロホルムを加え分液した。水相をクロロホルムでさらに2回抽出した。得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮した。残渣をショートカラム(展開溶媒 酢酸エチル:ジクロロメタン=1:4)で精製し目的物(18)を1.01 g (1.72 mmol) (34.4%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.19 (s, 1H), 8.14 (bs, 1H), 6.42 (dd, $J = 7.4, 6.4$ Hz, 1H),
5.44 (m, 1H), 4.41 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 3.00 (m, 1H),
2.80 (m, 1H), 2.58 (m, 3H), 1.17 (m, 18H).

(B) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-3, 5-ジ- α -イソブチリル- β -D-リボフラノシル)プリン(19)の合成

前記(A)で得た(18) 294 mg (0.5 mmol) をアルゴン雰囲気下で80 mlのチオフェンに溶解し、ファイレックス製光反応容器に移した。アルゴン気流下、400 W水銀ランプ紫外線を24時間照射した。照射後の反応溶液を濃縮し、残渣をショートカラム(展開溶媒 イソプロパノール:ジクロロメタン=3:197)で精製し目的物(19)を212 mg (0.39 mmol) (78.0%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.63 (dd, $J = 3.8, 1.2$ Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.10 (bs, 1H),

7.64 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.47 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H),
5.44 (m, 1H), 4.43 (m, 2H), 4.37 (m, 1H), 3.18 (m, 1H),
3.00 (m, 1H), 2.61 (m, 3H), 1.24 (m, 18H).

(C) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ- β -D-リボフラノシル)プリン(20)の合成

前記(B)で得た(19) 212 mg (0.39 mmol)を氷冷下1 M水酸化ナトリウム(ピリジン:メタノール:水=13:6:1) 1.95 mlに溶解し、15分間攪拌した。反応溶液に5%塩化アンモニウム水溶液を加え中和した。1.2 gのセライトを加え減圧下完全に溶媒を除いた。残渣をショートカラム(展開溶媒 5~7%エタノール-ジクロロメタン)で精製し目的物(20)を147 mg (0.37 mmol) (93.6%)得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ :

10.45 (bs, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.60 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H),
7.90 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 4.6, 3.5$ Hz, 1H),
6.39 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H),
4.91 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.55 (m, 2H),
2.96 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 1.11 (m 6H).

(D) 2-イソブチリルアミノ-6-(2-チエニル)-9-(2-デオキシ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル)プリン(21)の合成

前記(C)で得た(20) 98 mg (0.24 mmol)を1 mlの無水ピリジンで3回共沸した。残渣を2 mlの無水ピリジンに溶解し、トリエチルアミン 35 ml、ジメチルアミノピリジン 1.4 mgそして塩化ジメトキシトリチル 85 mgを加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液に25 mlの酢酸エチルを加え25 mlの水で3回分液し、有機相を得た。各々の水相を酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をショートカラム(展開溶媒 25~50%酢酸エチル-ジクロロメタン)で精製し目的物

(21) 132 mg (0.19 mmol) (76.7%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.64 (dd, $J = 3.6, 0.9$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.92 (bs, 1H),
7.61 (dd, $J = 4.3, 0.9$ Hz, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.24 (m, 8H),
6.77 (m, 4H), 6.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.79 (m, 1H),
4.13 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H),
3.44 (dd, $J = 10.23, 5.8$ Hz, 1H),
3.38 (dd, $J = 10.23, 4.4$ Hz, 1H), 2.91 (m, 1H),
2.60 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.27 (m, 6H).

(E) 2-イソブチルアミノ-6-(2-チエニル)-9-[2-デオキシ-3-O-[(ジイソプロピルアミノ)-(2-シアノエトキシ)]ホスフィノ-5-O-ジメトキシトリチル- β -D-リボフラノシル]プリン
(22) の合成

前記(D)で得た(21) 125 mg (0.18 mmol) を 0.5 ml の無水ピリジンで3回共沸し、0.5 ml の無水テトラヒドロフランで3回共沸した。残渣をアルゴン雰囲気下 1.2 ml の無水テトラヒドロフランに溶解し、ジイソプロピルエチルアミン 46 ml、そして塩化(2-シアノエトキシ)(N, N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン 59 ml を加え、室温で1時間攪拌したのち 50 ml のメタノールで未反応の塩化物を分解した。反応溶液に 25 ml の3% トリエチルアミン含有酢酸エチルを加え 25 ml の水で3回分液し、有機相を得た。各々の水相を3% トリエチルアミン含有酢酸エチルで洗った。有機相を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をショートカラム(展開溶媒 3% トリエチルアミン-32% 酢酸エチル-65% ヘキサン)で精製し、目的物(22) 139 mg (0.16 mmol) (92.2%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ :

8.64 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.61 (m, 1H),
7.26 (m, 2H), 7.24 (m, 8H), 6.78 (m, 4H), 6.45 (m, 1H),
4.75 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.75 (m, 6H), 3.70 (m, 4H),

3.36 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.48 (m, 1H),
1.95 (m, 1H), 1.18 (m, 18H).

^{31}P -NMR (270 MHz, CDCl_3): 149.51, 148.43 ppm.

実施例 3 : 3 - (2' -デオキシ-5' -O-トリホスホリル- β -D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (dYTP) (16) の合成 (第4図参照)

(A) 3 - (3', 5' -O-テトライソプロピルジシロキサニル- β -D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (12) の合成

3 - (β -D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (11) (J. Matulic-Adamic and L. Beigelman, *Tetrahedron Lett.*, 38, 203-206 (1997).) (2.29 mmol, 520 mg) を、無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン (23 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサン (2.52 mmol, 0.81 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加えて反応を止めた後、減圧濃縮した。残査をクロロホルムに溶解し、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (12) を 442 mg (0.94 mmol) (41%) 得た。

^1H -NMR (270.06 MHz, CDCl_3) δ : 13.07 (br, 1H, NH),

7.78 (d, 1H, H4, $J = 6.8$ Hz), 7.37 (d, 1H, H6, $J = 4.6$ Hz),

6.29 (t, 1H, H5, $J = 6.6$ Hz), 5.07 (s, 1H, H1'),

4.01-4.30 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H5''), 0.83-1.10 (m, 28H, iPr).

(B) 3 - (2' -O-イミダゾチオカルボニル-3', 5' -O-テトライソプロピルジシロキサニル- β -D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (13) の合成

前記 (A) で得た化合物 (12) (0.94 mmol, 442 mg) を無水トルエンで3回共

沸脱水後、無水DMF (9 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、チオカルボニルイミダゾライド (2.24 mmol, 401 mg) を加え、室温で7時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に酢酸エチルを加え、有機層を水で2回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (13) を 434 mg (0.749 mmol) (80%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270.06 MHz, CDCl_3) δ : 13.40 (br, 1H, NH),
8.44 (s, 1H, imidazolide), 7.84 (d, 1H, H4, $J = 6.8$ Hz),
7.73 (s, 1H, imidazolide), 7.33 (d, 1H, H6, $J = 6.5$ Hz),
7.07 (s, 1H, imidazolide), 6.34 (t, 1H, H5, $J = 6.8$ Hz),
6.23 (d, 1H, H2', $J = 5.1$ Hz), 5.25 (s, 1H, H1'),
4.46-4.52 (m, 1H, H3'), 4.25-4.29 (m, 1H, H5'),
4.03-4.09 (m, 2H, H4', H5''), 0.87-1.09 (m, 28H, iPr).

(C) 3-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサン- β -D-リボフラノシル) ピリジン-2-オン (14) の合成

前記 (B) で得た化合物 (13) (0.749 mmol, 434 mg) を無水トルエンで3回共沸脱水後、硫酸アンモニウム (8.4 mg) を加え、ヘキサメチルジシラザン (12.6 ml) に溶解し、1時間還流した。反応液を減圧濃縮後、無水トルエンで3回共沸脱水し、アゾビスイソブチロニトリル (83.5 mg) を加え、無水トルエン (16.8 ml) に溶解した。そこに、水素化トリブチルスズ (0.821 ml) を加え1時間還流した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (14) を 0.268 g (0.591 mmol) (79%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270.06 MHz, CDCl_3) δ : 13.07 (br, 1H, NH),
7.72 (d, 1H, H4, $J = 7.0$ Hz), 7.31 (d, 1H, H6, $J = 6.5$ Hz),
6.29 (t, 1H, H5, $J = 6.6$ Hz), 5.20-5.25 (m, 1H, H1'),
4.37-4.40 (m, 1H, H3'), 3.97-4.12 (m, 2H, H5', H5''),
3.80-3.84 (m, 1H, H4'), 2.26-2.36 (m, 1H, H2'),

1.77-1.86 (m, 1H, H2''), 0.90-1.09 (m, 28H, iPr).

(D) 3-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン
(15)の合成

前記(C)で得た化合物(14)(0.089 mmol, 42 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、1 Mテトラメチルアンモニウムフルオライド/THF溶液(0.5 ml)を加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に酢酸(0.08 ml)を加え、減圧濃縮した。残渣を水に溶解し、酢酸エチルで3回洗った後、水層を減圧濃縮した。残渣を逆相シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的物(15)を10.4 mg (0.047 mmol) (52%)得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CD₃OD) δ: 7.77 (d, 1H, H4, J = 3.8 Hz),

7.36 (d, 1H, H6, J = 3.5 Hz), 6.41 (t, 1H, H5, J = 3.6 Hz),

5.01-5.17 (m, 1H, H1'), 4.29-4.31 (m, 1H, H3'),

3.93-3.95 (m, 1H, H4'), 3.62-3.70 (m, 2H, H5', H5''),

2.31-2.35 (m, 1H, H2'), 1.89-1.95 (m, 1H, H2'').

(E) 3-(2'-デオキシ-5'-O-トリホスホリル-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン(16)の合成

前記(D)で得た化合物(15)(0.059 mmol, 13.4 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、リン酸トリメチル(0.2 ml)に溶解し、氷冷下オキシ塩化リン(0.065 mmol, 7.1 μl)を加え、氷冷下7時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応溶液に0.5 M ビストリブチルアンモニウムピロホスフェイト(bis-tributylammonium pyrophosphate)-DMF溶液とトリブチルアミン(70.2 μl)をよく攪拌した混合溶液を素早く加え、氷冷下30分間よく攪拌した。反応溶液に1 M重炭酸トリエチルアンモニウム(triethylammonium bicarbonate)

(0.35 ml)を加えて反応を停止し、減圧濃縮した。残渣を水に溶かし、DEAE-セファデックスA-25 カラムクロマトグラフィー(15×300 mm)にのせ、50 mM-1 M重炭酸トリエチルアンモニウムのグラジエントで溶出し、0.53-0.59 Mで溶出された画分を分取し、凍結乾燥した。

MS (ESI-), ^1H -NMR および ^{31}P -NMR により構造を確認した後、ダウエックス (Dowex) 50Wx8 カラムクロマトグラフィーによりナトリウム塩にした。

MS (ESI-): ($\text{M}-\text{H}^-$) 449.9.

^1H -NMR (270.06 MHz, D_2O) δ : 7.83 (d, 1H, H4, $J = 4.9$ Hz),

7.35 (d, 1H, H6, $J = 4.9$ Hz), 6.51 (t, 1H, H5, $J = 4.9$ Hz),

5.17 (t, 1H, H1', $J = 5.0$ Hz), 4.56 (br, 1H, H3'),

4.06 (br, 1H, H4'), 3.99 (br, 2H, H5', H5''),

2.19-2.33 (m, 1H, H2'), 1.81-1.98 (m, 1H, H2'').

^{31}P -NMR (109.36 MHz, D_2O) δ : -10.3 (m, 2P, P^1 , P^3),

-22.7 (m, 1P, P^2).

UV (10 mM phosphate buffer pH7.0): $\lambda_{\text{max}} = 298$ nm ($\epsilon = 7.6 \times 10^3$),

226 nm ($\epsilon = 7.0 \times 10^3$), $\lambda_{\text{min}} = 247$ nm, 211 nm.

実施例 4 : プライマー及びテンプレートの合成

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部の DNA/RNA 合成機 392 型により、同事業部より販売されている、dA, dC, dG, T の各シアノエチルアミダイト試薬と上記の方法で合成した dX のシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、以下に示すプライマーおよびテンプレートを合成した。

ただし、dX を含むオリゴマーの合成においては、dX のアミノ基の保護基であるベンゾイル基の除去が常法の濃アンモニア中 55℃、一夜の条件では、完全に除去できなかったもので、濃アンモニア中 80℃、10 時間処理することにより、完全に除去した。

Primer 1: dcgactcactataggg

Primer 2: dctatagggaggaga

Primer 3: dgcctagttgtaccg

Template 1: dtgctctaicttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 2: dtgctctgtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 3: dtgctctxtcttccctccctatagtgagtcgtattat

Template 4: dagctgtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 5: dagctxtgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 6: dagctxxgtgtgtctccggtacaactaggc

Template 7: dagctxtxtgtgtctccggtacaactaggc

Template 8: dagctxtgxgtgtctccggtacaactaggc

Template 9: dagctxtgtxtgtctccggtacaactaggc

実施例 5 : プライマーの 5' - ^{32}P 標識

0.5 ml のチューブにプライマー 1 - 4 (ca. 1 nmol)、10 x ポリヌクレオチドキナーゼ (polynucleotide kinase) バッファー (TAKARA) 2 μl 、[γ - ^{32}P] - dATP (ca. 1.1 TBq / mmol) 2 μl 、およびポリヌクレオチドキナーゼ (10 unit / μl , TAKARA) 2 μl を加え、全量 20 μl で、37℃、40 分間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 10 μl を加えて反応を停止し、75℃、5 分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動 (10 \times 10 cm) をした。UV (254 nm) でメインバンドを切り出し、1.5 ml チューブに移し滅菌水を 450 μl を加えて、37℃、12 時間攪拌した。軽く遠心した上清を別のチューブに移し、グリコーゲン 1 μl 、3 M 酢酸ナトリウム 40 μl およびエタノール 1 ml を加え、よく攪拌した後、-30℃で 1 時間放置した。-5℃、13,000 rpm で 1 時間遠心した後、沈殿を 70% エタノールでリンスし、遠心エバポレーターで 30 分間乾燥した。そこに、滅菌水 40 μl を加え、75℃で 5 分間加熱した後、UV (260 nm) で定量した。

実施例 6 : クレノウフラグメント (Klenow Fragment) を用いたシングルヌクレオチド挿入反応とプライマー伸長反応

0.5 ml のチューブに 5' - ^{32}P ラベルしたプライマー、テンプレートおよび 10

x クレノウフラグメントバッファー (TAKARA) 1 μ l を加え全量を 7 μ l にして、95℃で3分間、40℃で3分間、4℃で7分間アニーリングした後、dNTP 1 μ l、クレノウフラグメント (1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA) 2 μ l を加え、全量を 10 μ l にして、17℃で所定の時間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 5 μ l を加えて反応を停止し、75℃、5分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動をした。それを、イメージングプレート (Phosphoroimager analysis) を用いて分析した。

結果を第6図、第7図、第9図に示す。シングルヌクレオチド挿入反応を第7図に、プライマー伸長反応を第6図、第9図にそれぞれ示す。

実施例7：クレノウフラグメントを用いたプライマー伸長反応の阻害実験

0.5 ml のチューブにプライマー、テンプレートおよび 10 x クレノウフラグメントバッファー (TAKARA) 1 μ l を加え全量を 7 μ l にして、95℃で3分間、40℃で3分間、4℃で7分間アニーリングした後、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ TTP あるいは $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTP および dYTP をそれぞれの終濃度になるように加え、クレノウフラグメント (1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA) 2 μ l を加え、全量 10 μ l にして、17℃で所定の時間インキュベートした。そこに、10 M 尿素 B P B ダイ (dye) 5 μ l を加えて反応を停止し、75℃、5分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド 7 M 尿素ゲル電気泳動をした。それを、イメージングプレート (Phosphoroimager analysis) を用いて分析した。

結果を第8図に示す。

実施例8：T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

プロモーター領域を二本鎖化した 1 μ M の鋳型 DNA と 2.5 units の T7 RNAポリメラーゼを、2 mM rNTP - 0.1 μ Ci / μ l の $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ rATP を含む溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, 5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 10 mM rGMP,) に加え、3時間インキュベートした。反応後、これに 10 M 尿素を含む色素を加え、75℃で3分間加熱し、20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、生成物を分析した。

結果を第 10 図に示す。

実施例 9 : T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

実施例 8 と同様の反応を行い、生成した RNA をゲル電気泳動で単離し、0.75 units の RNase T2 で RNA を分解し、それぞれのヌクレオチドを二次元 TLC で分離し、それぞれの比を求めた。

結果を第 11 図に示す。また、先の表 1 にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

実施例 10 : Klenowフラグメント (exo⁺) を用いた 1ヌクレオチド挿入反応

[5' - ³²P] ラベルしたプライマー DNA (20-mer, 4 mM)、鋳型 DNA (35-mer, 4 mM) および 2x Klenowフラグメント用緩衝液 (TAKARA) を含む溶液を、95℃ 3 分間、40℃ 3 分間、4℃ 7 分間アニーリングした後、これに等量の 40 mM dNTP と Klenowフラグメント (exo⁺) (2 units, For Sequencing, TAKARA) の溶液を加え、37℃ で 30 分インキュベートした。これに等量の 10 M urea-BPB dye 溶液を加えて、75℃ で 5 分間加熱した後、20% ポリアクリルアミド-7 M 尿素ゲルで電気泳動を行った。Phosphorimager プレートを用いて生成物の分析を行った。結果を第 12 図に示す。

実施例 11 : T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

プロモーター領域を二本鎖化した 1 mM の鋳型 DNA、2.5 units の T7 RNAポリメラーゼ、2 mM rNTP、0.1 mCi/ml の [α -³²P] rATP を含む溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 8.0)、8 mM MgCl₂、2 mM spermidine、5 mM DTT、0.01% Triton X-100、10 mM rGMP) を調製し、3 時間インキュベートした。これに 10 M 尿素を含む色素溶液を加え、75℃ で 3 分間加熱し反応を停止した。この溶液中の生成物の RNA (16-mer) を 20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。この RNA を 0.75 units の RNase T2 で分解し、2 次

元TLC（セルロース樹脂）により、それぞれのヌクレオチドの比を求めた。第13図にそのTLCの展開図を示す。また、先の表2にそれぞれのヌクレオチドの組成比を示す。

実施例12：塩基X2を含有するプライマー及びテンプレートの合成

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部のDNA/RNA合成機392型により、同事業部より販売されている、dA、dC、dG、Tの各シアノエチルアミダイト試薬と実施例1の方法に準じて合成したdx₂のシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、プライマー及びテンプレートを合成した。

ただし、ここで用いたdx₂の2-アミノ基の保護基のイソブチリル基は、オリゴマー合成後の通常の塩基性条件下（55℃、10時間の濃アンモニア水処理）での脱保護法では完全に除去できなかったもので、80℃、10時間の濃アンモニア水処理を行った。

産業上の利用可能性

本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な塩基対形成が立体障害、及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用することによって実現可能であることを示したものである。本発明の方法により、核酸の複製、転写、および、これを用いてタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できる。例えば、本発明の人工塩基対を用いることにより、天然の4種類の塩基で行われているインビトロセクション法を6種類の塩基で行うことができ、4種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製や、さらに遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、本発明の新しい塩基対を利用することも可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 核酸の塩基部分に、塩基相互間の立体障害を起こさせ得る基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。
2. 立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 立体障害を起こさせ得る基が、ジアルキルアミノ基である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 核酸の塩基部分に、塩基相互間の立体障害及び静電的な反発、並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。
5. 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求の範囲第4項に記載の方法。
6. 立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基が、芳香複素環式基である請求の範囲第4項又は第5項に記載の方法。
7. 芳香複素環式基が、異種原子として1又は2個の硫黄原子、酸素原子又は窒素原子を有する5又は6員環の芳香複素環式基である請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 芳香複素環式基が、チオフェンである請求の範囲第6項又は第7項に記載の方法。
9. さらに、新たな水素結合を形成し得る基を導入する請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。
10. 新たな水素結合を形成し得る基が、アミノ基、水酸基、ケト基又は窒素原子の電子対である請求の範囲第9項に記載の方法。
11. 塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の方法。
12. ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求の範囲11に記載の方法。
13. 核酸の塩基部分における立体障害を利用して、選択的な塩基対を形成させ

るように核酸をデザインする方法。

14. 立体障害の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
15. 核酸の塩基部分における立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用して、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
16. 立体障害及び静電的な反発の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、さらにスタッキング作用を有することにより安定化させることにより選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。
17. 核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求の範囲第13項～第16項のいずれかに記載の核酸をデザインする方法。
18. 請求の範囲第13項～第17項のいずれかに記載の方法でデザインされた核酸。
19. 核酸が、6位に立体障害を起こさせ得る基を有するプリン誘導体からなる塩基を含有するものである請求の範囲第18項に記載の核酸。
20. 核酸の塩基が、2-アミノ-6-N, N-ジメチルアミノ-プリンである請求の範囲第19項に記載の核酸。
21. 核酸の塩基が、2-アミノ-6-チエニル-プリン又はその誘導体である請求の範囲第19項に記載の核酸。
22. 核酸が、2位にヒドロキシ基又はケト基を有するピリジンからなる塩基を含有するものである請求の範囲第18項に記載の核酸。
23. 核酸の塩基が、ピリジン-2-オン又はその互変異性体である請求の範囲第22項に記載の核酸。
24. 核酸が、その相補的な核酸と塩基対を形成している核酸である請求の範囲第18項～第23項のいずれかに記載の核酸。
25. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を製造する方法。
26. 核酸が、塩基対を形成し得る他方の核酸である請求の範囲第25項に記載の製造方法。
27. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を1個以上含有してなるコドン。

28. コドンがアミノ酸をコードするものである請求の範囲第27項に記載のコドン。
29. アミノ酸が非天然型のアミノ酸である請求の範囲第28項に記載のコドン。
30. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子。
31. 核酸分子が蛋白質をコードしてなる請求の範囲第30項に記載の核酸分子。
32. 核酸分子が、天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持している請求の範囲第30項又は第31項に記載の核酸分子。
33. 請求の範囲第30項～第32項のいずれかに記載の核酸分子にポリメラーゼを作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造する方法。
34. ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求の範囲33に記載の方法。
35. 天然の遺伝子に、請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法。
36. 請求の範囲第18項～第24項のいずれかに記載の核酸を導入又は置換された位置が、コドン単位となっており、他の部分のアミノ酸配列が天然のものと変更されていない塩基配列となる請求の範囲第35項に記載の非天然型の遺伝子を製造する方法。
37. 請求の範囲第30項～第32項のいずれかに記載の核酸分子、又は請求の範囲第35項又は第36項の方法で得ることができる非天然型の遺伝子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法。
38. 天然の蛋白質のアミノ酸の一部又は全部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質である請求の範囲第37項に記載の蛋白質を製造する方法。
39. 請求の範囲第35項又は第36項に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子で形質転換された微生物。
40. 請求の範囲第35項又は第36項に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子を用いて、天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法。



要 約 書

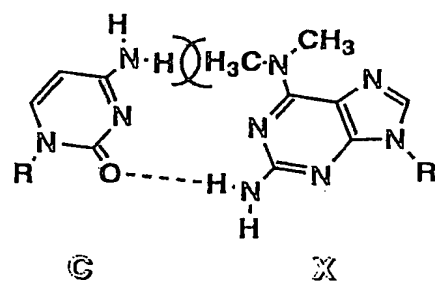
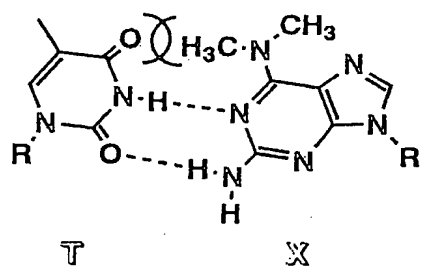
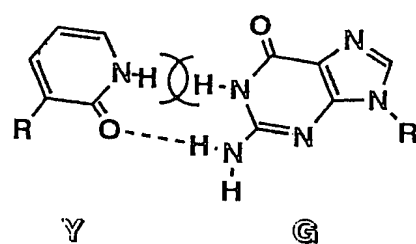
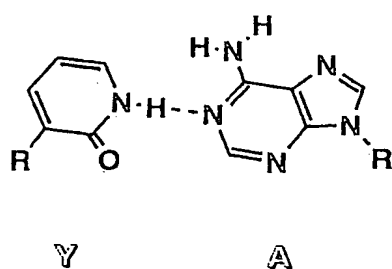
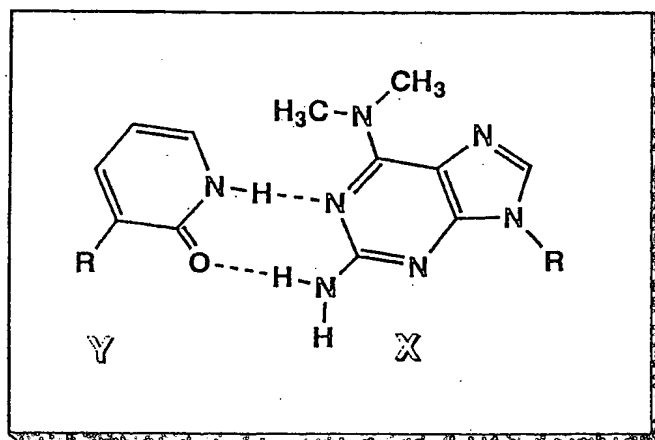
本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対、及びそれをデザインする方法についての新規な概念を提供するものである。

本発明は、立体障害を有する基、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を有する基を導入することにより選択的な塩基対を形成し、かつDNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害、静電的な反発、スタッキング作用を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸の塩基をデザインする方法に関する。

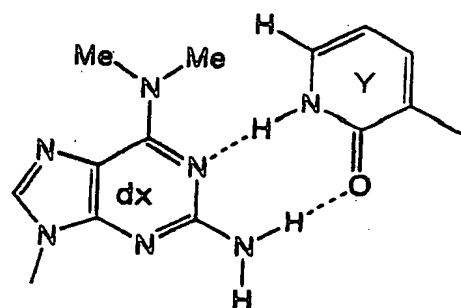
さらに、本発明は、これらの人工の核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。



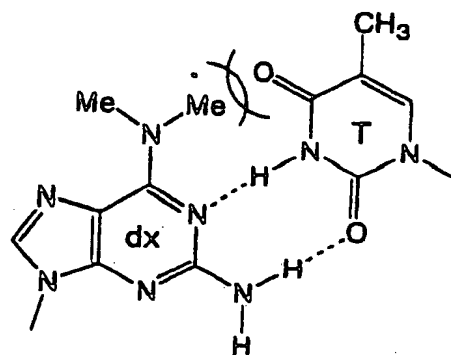
第 1 图



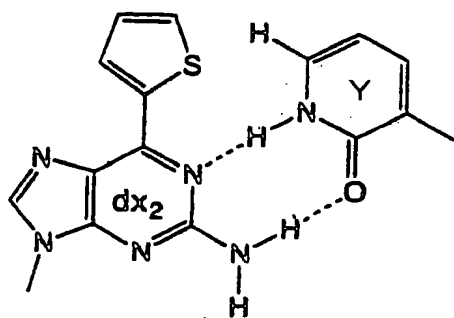
a



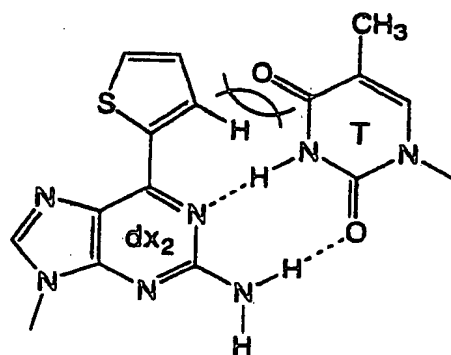
b



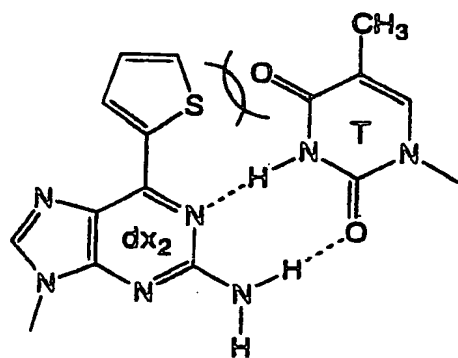
c



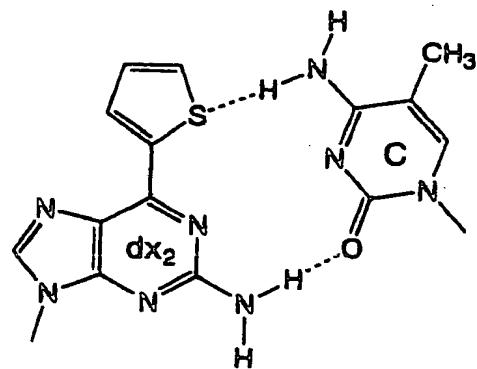
d

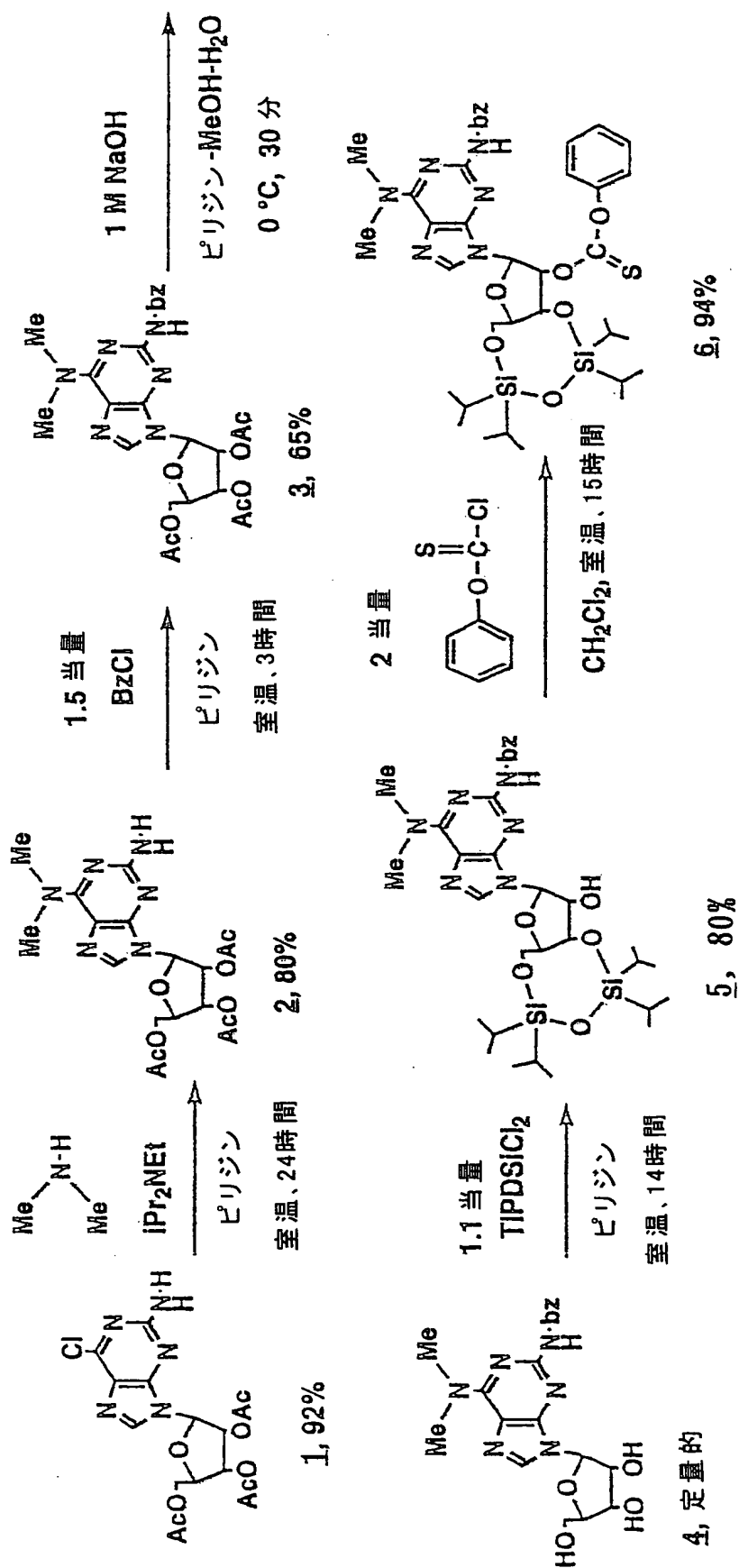


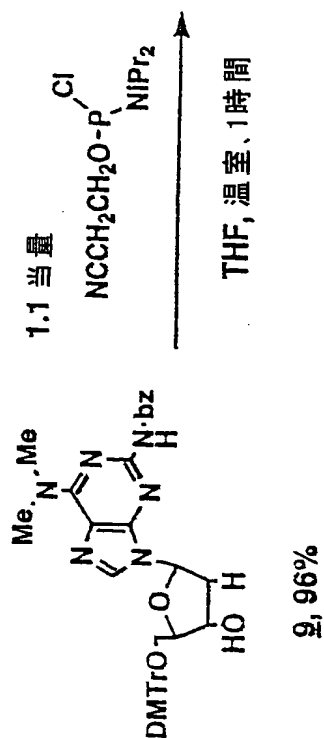
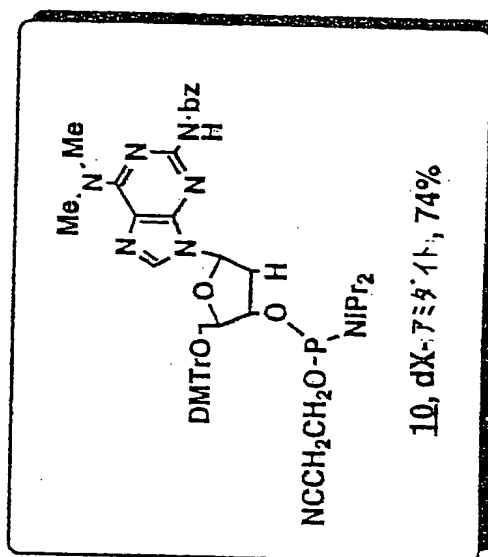
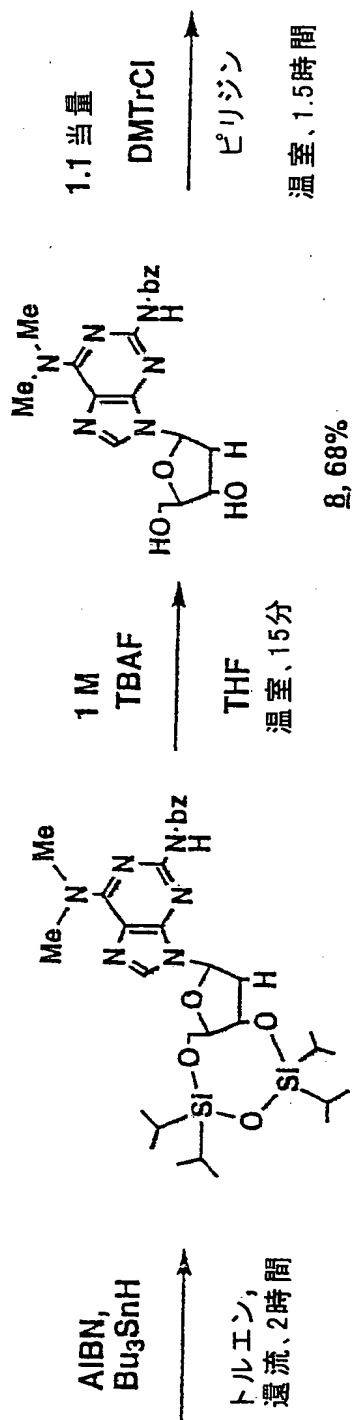
e



f

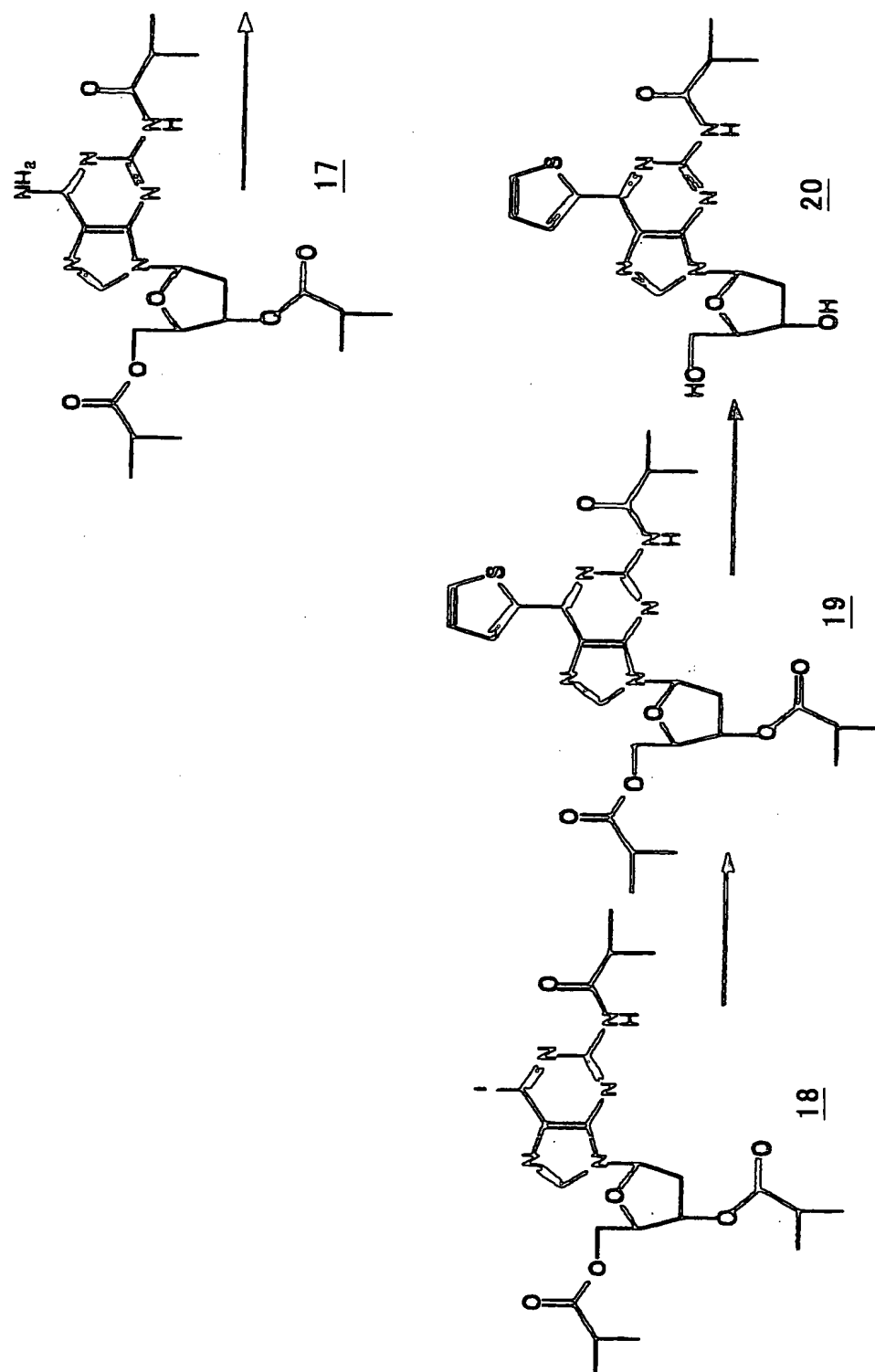


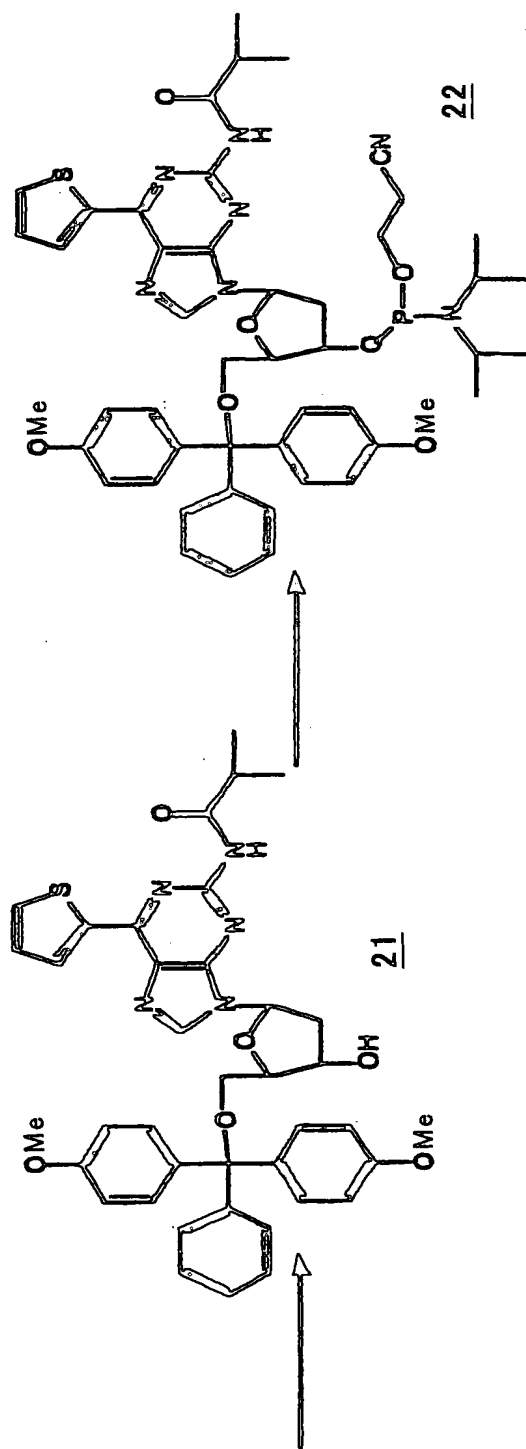




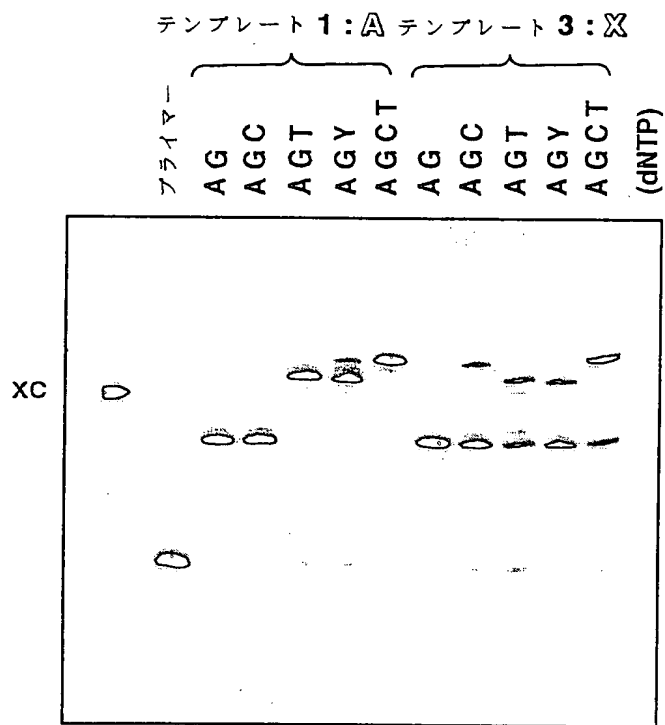


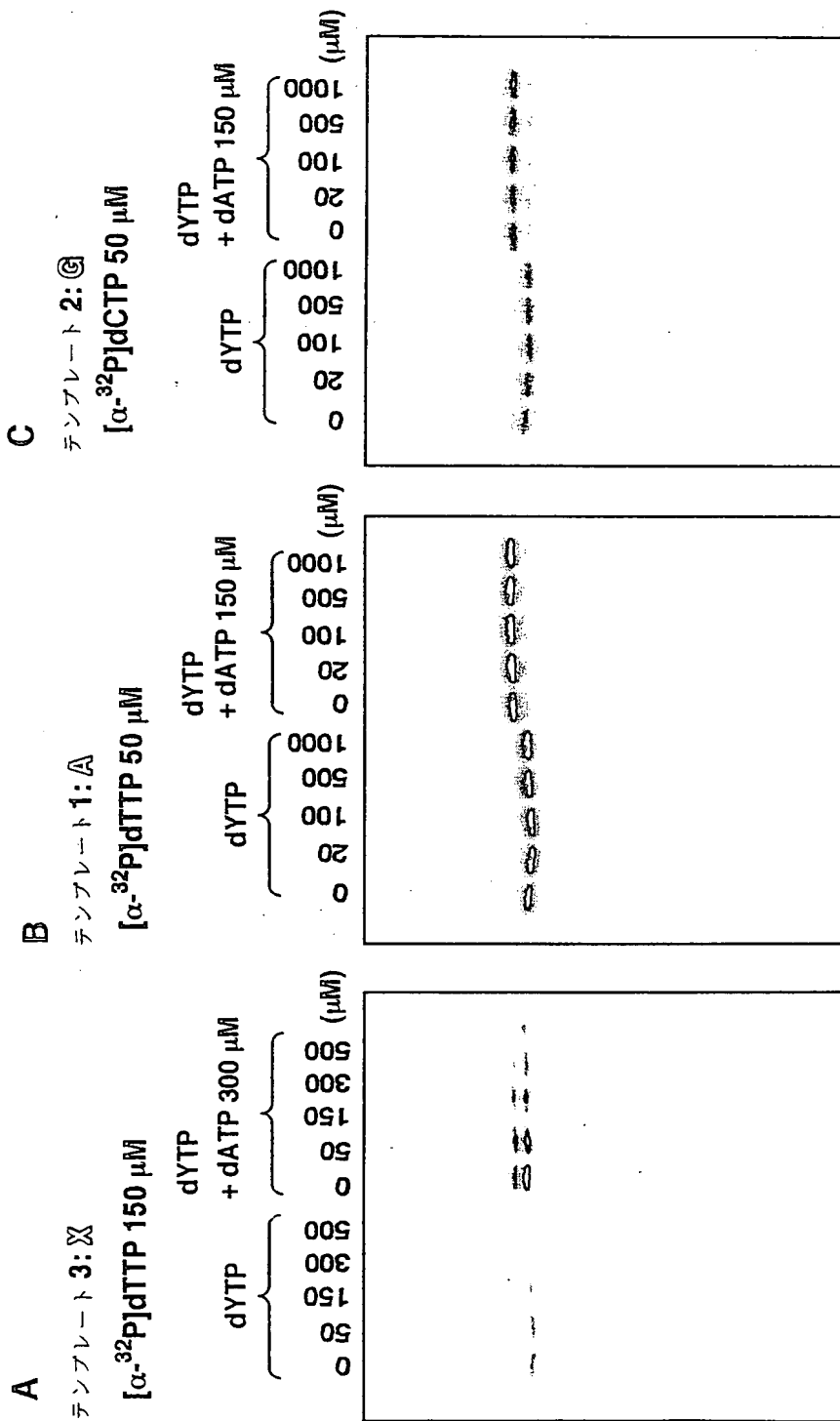
第 5 图



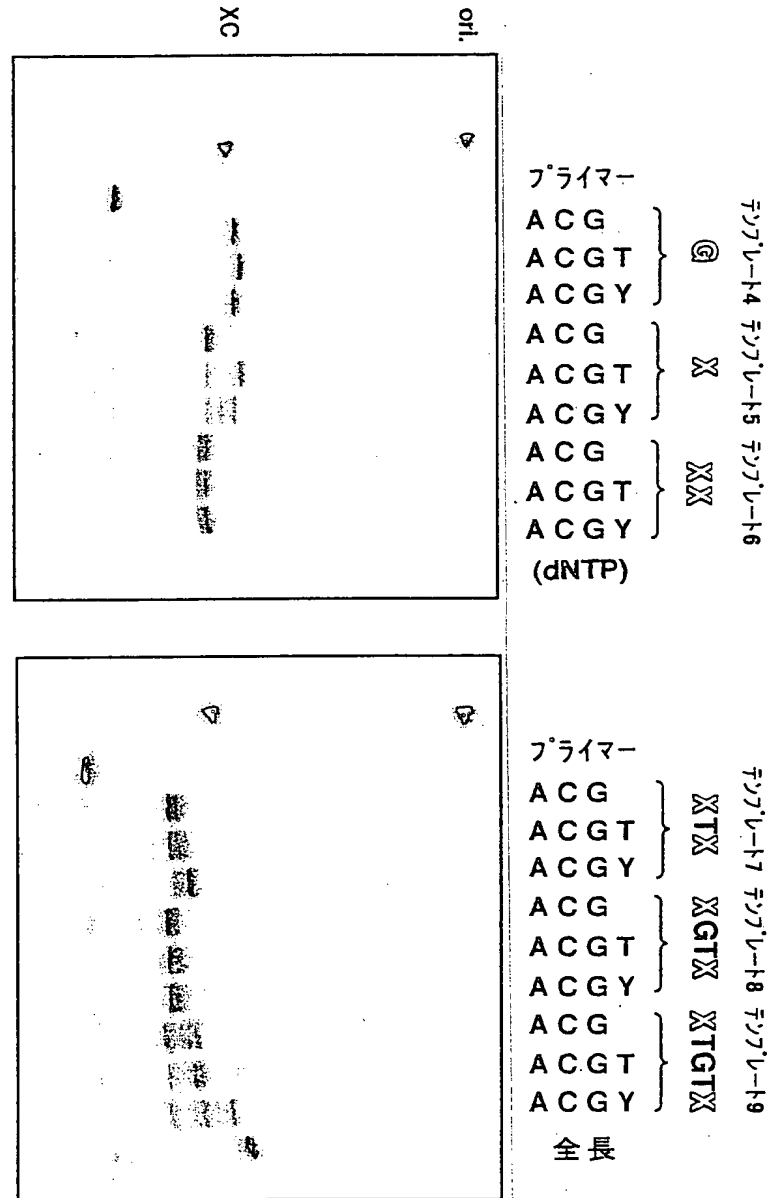


第 6 図

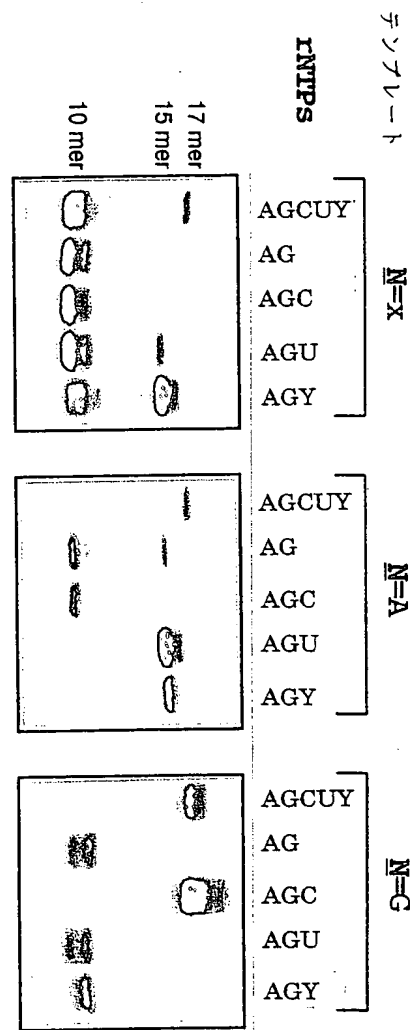




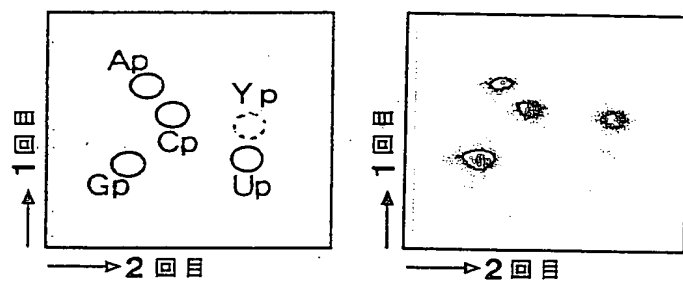
第 9 図



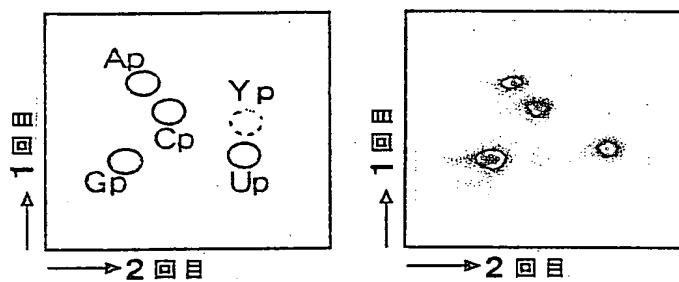
第 10 図

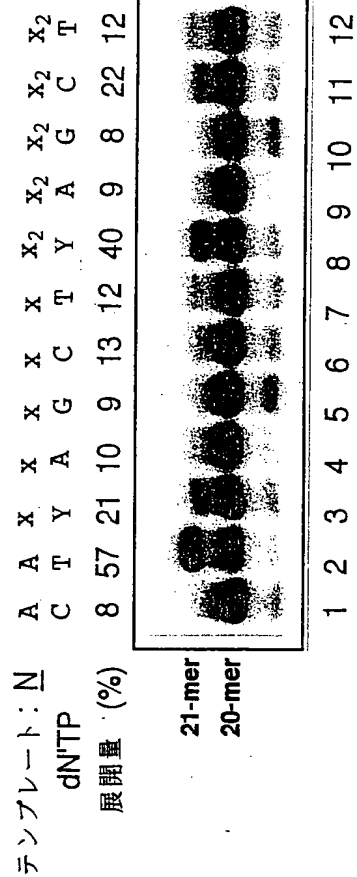


A

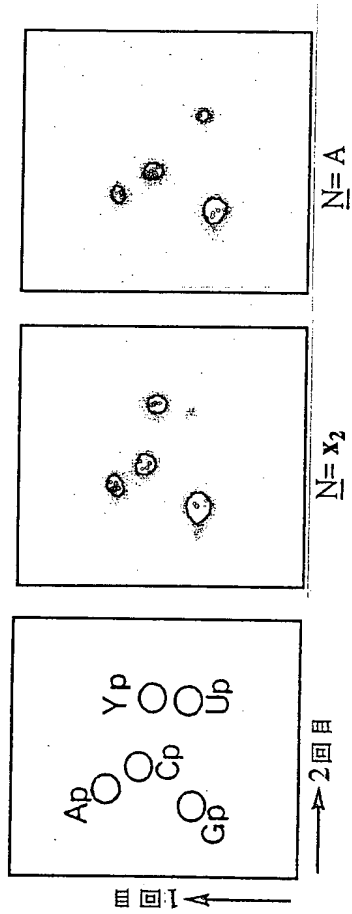


B





第 13 図



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building
9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 August 2000 (16.08.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA903589	International application No. PCT/JP00/04720

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

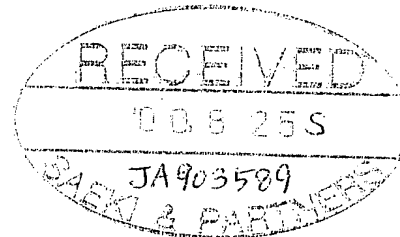
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)
HIRAO, Ichiro et al (for US)

International filing date : 14 July 2000 (14.07.00)
Priority date(s) claimed : 15 July 1999 (15.07.99)
02 May 2000 (02.05.00)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 28 July 2000 (28.07.00)

List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : CA, JP, US




ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:  Shinji IGARASHI</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---



INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所



殿

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP00/04720

RO105

発送日（日、月、年）

25.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA903589

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/04720

国際出願日（日、月、年）

14.07.00

優先日（日、月、年）

15.07.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、25日07月00年 に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所



殿

P C T

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP00/04720

SA202

発送日（日．月．年）

25.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA903589

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/04720

国際出願日（日．月．年）

14.07.00

優先日（日．月．年）

15.07.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

25 日 07 月 00 年（受理の日）

2. ☐ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

